

SILVIO LUIZ DE OLIVEIRA SOGLIA

ENRIQUECIMENTO DE LEITE TIPO C COM FERRO AMINOÁCIDO
QUELATO: BIODISPONIBILIDADE E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS E SENSORIAIS

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
OUTUBRO - 1996

SILVIO LUIZ DE OLIVEIRA SOGLIA

ENRIQUECIMENTO DE LEITE TIPO C COM FERRO AMINOÁCIDO
QUELATO: BIODISPONIBILIDADE E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS E SENSORIAIS

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

APROVADA: 28 de fevereiro de 1996.

Prof^a June Ferreira M. Parreiras
(Conselheira)

Prof. Gilberto Paixão Rosado
(Conselheiro)

Prof. José Benício P. Chaves

Prof^a Neuza Maria Brunoro Costa

Prof. Sebastião César Cardoso Brandão
(Orientador)

A toda minha família, em especial, ao meu pai “in memoriam” e à minha
mãe, pelo apoio aos meus estudos.

À minha esposa Conça e aos meus filhos Vinícius e Daniel, pela
compreensão e pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelo acolhimento e pela contribuição à minha formação acadêmica.

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

Ao professor Sebastião César Cardoso Brandão, pela orientação e pela convivência amigável e respeitosa.

Ao professor Gilberto Paixão Rosado, pelo aconselhamento e pelo estímulo constante.

À professora June Ferreira Maia Parreiras, pelas sugestões apresentadas.

À professora Neuza Maria Brunoro Costa, pela inestimável ajuda e pelos ensinamentos na área de Nutrição.

Ao professor José Benício Paes Chaves, pela discussão estatística do experimento.

Ao professor José Carlos Gomes, pelo uso do Laboratório de Análise de Alimentos.

À Ana, pelo grande auxílio na realização das análises físico-químicas.

Aos amigos Aelson Almeida, Jerônimo Rodrigues, Rejane Hansen e Juan Uquillas.

A todos os meus colegas, “companheiros de luta e de folia”.

Aos funcionários do DTA, pela convivência e pelo apoio.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, em especial, à Dona Zezinha e ao Ricardo, pelo auxílio.

Enfim, a todos que colaboraram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Silvio Luiz de Oliveira Soglia, filho de Silvio Soglia e de Leda de Oliveira Soglia, nasceu em Jequié-Bahia, em 9 de setembro de 1963.

Graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal da Bahia, em dezembro de 1985.

Ingressou na Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, como professor de ensino superior, em agosto de 1986.

Em agosto de 1993, 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 fevereiro de 1996.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
EXTRATO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Importância do ferro na dieta humana	3
2.2. Absorção, transporte e armazenamento do ferro	4
2.3. Prevalência e caracterização da deficiência de ferro	7
2.4. Exigências, recomendações e fontes minerais e dietéticas de ferro	9
2.5. Prevenção ou tratamento da deficiência de ferro	13
2.6. Enriquecimento de alimentos com ferro	14
2.7. Adição de ferro em leite e derivados	17
2.8. Efeitos da adição do ferro ao leite	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Preparo das amostras (obtenção do leite enriquecido)	24
3.2. Ensaio de biodisponibilidade	25
3.2.1. Procedimentos analíticos	25
3.2.1.1. Caracterização das dietas	25

	Página
3.2.1.2. Determinação do ferro elementar	26
3.2.1.3. Determinação dos níveis de hemoglobina	26
3.2.1.4. Determinação do valor biológico relativo (VBR) do ferro aminoácido quelato	27
3.2.2. Formulação das dietas experimentais	27
3.2.3. Modelo experimental	30
3.3. Análises físico-químicas	31
3.3.1. Acidez titulável	31
3.3.2. pH	31
3.3.3. Teor de gordura	31
3.3.4. Efeito na oxidação da gordura (índice de TBA)	32
3.4. Análise sensorial	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Ensaio de biodisponibilidade	35
4.1.1. Caracterização físico-química do leite enriquecido e das dietas experimentais	35
4.1.2. Valor biológico relativo do ferro aminoácido quelato	37
4.1.3. Ganho de peso e consumo de dieta	40
4.2. Análises físico-químicas	42
4.2.1. Acidez titulável	42
4.2.2. pH	45
4.2.3. Teor de gordura	47
4.2.4. Oxidação da gordura (índice de TBA)	47
4.3. Análise sensorial	51
5. RESUMO E CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE	62

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Quantidade de ferro que deve ser absorvida diariamente para manter a homeostase	10
2. Recomendações diárias de ferro	10
3. Fontes de ferro para fortificação de alimentos e algumas características principais	12
4. Conteúdo de ferro em leite e derivados	18
5. Composição percentual da dieta basal oferecida aos ratos na fase de depleção	27
6. Composição percentual dos ingredientes da mistura vitamínica utilizada no preparo das dietas	28
7. Composição percentual dos ingredientes da mistura mineral utilizada no preparo das dietas	29
8. Composição físico-química das amostras de leite em pó enriquecido com ferro, usadas na preparação das dietas experimentais	36
9. Composição físico-química das dietas experimentais	36
10. Níveis e ganho de hemoglobina (g/100 ml de sangue) determinados durante a fase de regeneração de ratos anêmicos, submetidos a dietas contendo leite enriquecido com ferro	38

	Página
11. Valor biológico relativo (VBR) de algumas fontes de ferro, adicionadas ao leite, determinado por vários autores	40
12. Peso final, ganho de peso e consumo de dieta, obtidos durante a fase de regeneração de ratos anêmicos, submetidos a dietas contendo leite enriquecido com ferro	41
13. Avaliação sensorial para sabor oxidado das amostras de leite enriquecido com ferro	52
1A. Análise de variância da regressão para o ganho de hemoglobina	63
2A. Análise de Variância da regressão para o ganho de peso	63
3A. Análise de Variância da regressão para o consumo de dieta	64
4A. Análise de Variância dos valores de acidez Dornic	64
5A. Análise de Variância dos valores de pH	65
6A. Análise de Variância dos valores de absorvância como expressão do índice de TBA	65
7A. Análise de Variância dos valores de absorvância como expressão do índice de TBA, para o tratamento homogeneizado	66
8A. Análise de Variância dos valores de absorvância como expressão do índice de TBA, para o tratamento não-homogeneizado	66
9A. Análise de Variância dos resultados da análise sensorial para sabor oxidado	67
10A. Análise de Variância dos resultados da análise sensorial (sabor oxidado) para ferro aminoácido quelato	67
11A. Análise de Variância dos resultados da análise sensorial (sabor oxidado) para sulfato ferroso	68
12A. Análise de Variância dos resultados da análise sensorial (sabor oxidado) para o tratamento homogeneizado	68

13A. Análise de Variância dos resultados da análise sensorial (sabor oxidado) para o tratamento não homogeneizado	69
14A. Valores para ganho de hemoglobina, consumo de dieta e ganho de peso durante a fase de regeneração	70
15A. Níveis de hemoglobina (g/100 ml) de ratos submetidos às dietas experimentais, medidos no início da fase de regeneração (tempo 0)	72
16A. Níveis de hemoglobina (g/100 ml) de ratos submetidos às dietas experimentais, após 7 dias da fase de regeneração	72
17A. Níveis de hemoglobina (g/100 ml) de ratos submetidos às dietas experimentais, após 14 dias da fase de regeneração	73
18A. Ingestão de ferro dietético (mg) em ratos submetidos às dietas experimentais, após 7 dias da fase de regeneração	73
19A. Ingestão de ferro dietético (mg) em ratos submetidos às dietas experimentais, após 14 dias da fase de regeneração	74
20A. Ingestão total de ferro dietético (mg) em ratos submetidos às dietas experimentais, durante a fase de regeneração	74
21A. Peso (g) dos ratos no início da fase de regeneração (tempo 0)	75
22A. Peso (g) dos ratos após 7 dias da fase de regeneração	75
23A. Peso (g) dos ratos após 14 dias da fase de regeneração	76
24A. Consumo semanal de dieta dos ratos (1 ^a semana da fase de regeneração)	76
25A. Consumo semanal de dieta dos ratos (2 ^a semana da fase de regeneração)	77
26A. Valores de pH e acidez dornic para amostras de leite enriquecidas com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato	78
27A. Valores de absorvância como expressão do índice de TBA para amostras de leite enriquecida com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato	82
28A. Valores dos escores para sabor oxidado, atribuídos às amostras de leite enriquecidas com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato ..	88

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Quantidades de ferro em porções médias de vários alimentos	11
2. Fluxograma dos procedimentos experimentais	23
3. Modelo de ficha para análise sensorial do leite enriquecido com ferro aminoácido quelato e sulfato ferroso, em vários níveis de adição	34
4. Análise da biodisponibilidade relativa do ferro aminoácido quelato calculada pela inclinação da reta (método-padrão da AOAC, 1984) ..	39
5. Ganho de peso de ratos, em função da quantidade de ferro ingerido, provenientes de diferentes dietas, contendo leite em pó, enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato	43
6. Variação da acidez titulável do leite enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato, em diferentes dosagens	44
7. Variação da acidez titulável do leite enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato, em função do tempo de estocagem a 5°C	44
8. Variação do pH de leite enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato em diferentes dosagens	45
9. Variação do pH do leite enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato, em função do tempo de estocagem a 5°C	46

	Página
10. Valores de absorvância como expressão do índice de TBA em leite enriquecido com diferentes dosagens de sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato	48
11. Valores de absorvância como expressão do índice de TBA em leite enriquecido, em função do tempo de estocagem a 5°C	49
12. Valores de absorvância como expressão do índice de TBA em leite homogeneizado e não-homogeneizado enriquecido, com diferentes dosagens de sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato	50
13. Efeito da adição de diferentes níveis de ferro no desenvolvimento de sabor oxidado para o leite homogeneizado e não-homogeneizado enriquecido com sulfato ferroso	53
14. Efeito da adição de diferentes níveis de ferro no desenvolvimento de sabor oxidado para o leite homogeneizado e não-homogeneizado enriquecido com ferro aminoácido quelato	53

EXTRATO

SOGLIA, Silvio Luiz de Oliveira, M.S. Universidade Federal de Viçosa outubro de 1996. *Enriquecimento de leite tipo C com ferro aminoácido quelato: biodisponibilidade e características físico-químicas e sensoriais*. Professor orientador: Sebastião César Cardoso Brandão. Professores conselheiros: Gilberto Paixão Rosado e June Ferreira Maia Parreiras.

Foram enriquecidas amostras de leite tipo C com ferro aminoácido quelato e sulfato ferroso, em diferentes níveis de adição (0, 6, 12, e 24 mg/l). Metade delas foi homogeneizada e todas as amostras foram submetidas a análises físico-químicas de pH, acidez, teor de gordura e índice de TBA, além de teste sensorial com julgadores treinados para sabor oxidado, durante um período de estocagem de três dias, sob refrigeração a 5°C. Estudou-se, ainda, a biodisponibilidade relativa do ferro aminoácido quelato, por meio da regeneração dos níveis de hemoglobina em ratos anêmicos. Os resultados obtidos mostraram que o ferro aminoácido quelato, adicionado ao leite, apresentou uma biodisponibilidade que não diferiu estatisticamente ($p > 0,01$) do sulfato ferroso, sendo capaz de restabelecer, em 14 dias, os níveis de hemoglobina em ratos anêmicos, quando adicionado nos níveis de 12 e 24 mg/l. O uso de 24 mg de ferro/l de leite, na forma de

ferro aminoácido quelato, manteve as características físico-químicas do leite, não alterando o sabor, durante todo período de estocagem a 5°C, enquanto o sulfato ferroso, nas dosagens de 12 e 24 mg/litro, promoveu alterações na oxidação da gordura, influenciando no sabor do leite, que foi perceptível pelo painel de julgadores, sem contudo alterar as suas características físico-químicas de acidez e pH. Para ambas as fontes de ferro, o processo tecnológico de enriquecimento do leite mostrou-se simples e de fácil execução, sem modificar apreciavelmente a rotina de processamento do leite tipo C. Desta forma, o ferro aminoácido quelato mostrou-se superior ao sulfato ferroso no enriquecimento do leite tipo C, dadas as suas características nutricionais, físico-químicas e sensoriais satisfatórias, nos níveis de 12 e 24 mg/l, com potencial para uso em programas institucionais de suplementação alimentar, no combate à anemia ferropriva

ABSTRACT

SOGLIA, Silvio Luiz de Oliveira, M.S., Viçosa Federal University, october 1996. Universidade Federal de Viçosa Julho de 1996. *Fortification of "type C" milk with iron amino acid chelate: bioavailability and physical, chemical and sensory characteristics.* Adviser: Sebastião César Cardoso Brandão. Committee Members: Gilberto Paixão Rosado and June Ferreira Maia Parreiras.

Four different levels of ferrous aminoacid chelate and ferrous sulfate were added to grade C padronized (3,2%) milk. The influence of homogenization and the pH, acidity, fat, lipid oxidation (TBA test) , and sensorial analysis were evaluated during three days of storage at 5°C. The bioavailability of both iron sources was determined by the hemoglobin depletion-repletion technique using rats. The results demonstrated that the bioavailability did not present statistical difference ($p>0,01$) of both iron sources, since they were capable to restaure hemoglobin levels in anemic rats in 14 days, when added in the levels of 12 e 24 mg/l elemental iron. The highest concentration of ferrous aminoacid chelate (24 mg/l iron) presented no influence in the physical-chemical characteristics studied, and also in the flavor evaluation. However the ferrous sulfate at 12 and

24 mg/l , presented flavor and lipid oxidation changes, statistically detect by the judges panel, but without changing the pH and acidity. Homogenization, followed by LTLT pasteurization (65°C for 30 min.) increase the TBA level from 0,019 (absorbance at 532 nm) to 0,033 at zero time. This difference in TBA was maintained during the three days of storage. The ferrous aminoacid chelate was then considered superior to ferrous sulfate at 12 and 24 mg/l because it did not change the flavor and the characteristics of milk during storage for three days at 5°C. We therefore recommend that it can be used in institucional program for milk supplementation, to reduce iron deficiency.

1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento, que faz parte da dieta diária do ser humano, sendo de grande importância na alimentação de grupos biologicamente vulneráveis, em especial crianças e adolescentes, por ser um bom suprimento de proteínas, vitaminas e alguns minerais, como cálcio e fósforo. No entanto, a ingestão média de 400 ml, por dia, fornece apenas 2% da recomendação diária de ferro, considerando o Recommended dietary allowances (RDA) igual a 10 mg (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989).

A adição complementar de nutrientes ao leite tem sido, há muito tempo estudada e recomendada, em virtude de sua contribuição no combate a deficiências nutricionais graves de populações, cuja dieta não permite o suprimento adequado de algum nutriente essencial. Contudo, a adição de micronutrientes em alimentos, no Brasil, ao contrário de países desenvolvidos, ainda é muito reduzida, em virtude, dentre outras coisas, de falta de uma legislação específica, que garanta a sua obrigatoriedade.

A anemia ferropriva decorrente da deficiência alimentar de ferro é um distúrbio nutricional de grande prevalência em nossa população, principalmente em crianças até dois anos de idade, gestantes e lactantes. As conseqüências desta anemia incluem a susceptibilidade a infecções, o

atraso no desenvolvimento e a redução das capacidades física e intelectual dos indivíduos anêmicos.

Estima-se que cerca de 1 bilhão de pessoas, em todo o mundo, apresentam deficiência de ferro. No Brasil, dados do Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (BRASIL, 1986) mostram que esta prevalência é cerca de 40%, em média, afetando principalmente crianças, adolescentes e mulheres grávidas.

A fortificação de alimentos tem sido recomendada, como o melhor método de prevenção e combate à deficiência de ferro em uma população. No entanto, esta prática ainda é controversa, devido aos resultados conflitantes, que têm sido obtidos com as várias fontes de ferro utilizadas. Uma das questões mais importantes é a disponibilidade do ferro e sua assimilação pelo organismo humano. Outros aspectos relevantes da adição de ferro, em alimentos, envolvem a identificação de alimentos adequados ao enriquecimento, alteração na cor do produto, desenvolvimento de sabor estranho, sedimentação de compostos pouco solúveis, entre outros.

Tendo em vista a importância da anemia ferropriva, como problema de saúde pública, e a fortificação de alimentos, como um mecanismo capaz de corrigir esta deficiência nutricional, a proposta deste trabalho foi estudar os efeitos do enriquecimento do leite tipo C com ferro aminoácido quelato, procurando obter-se um produto com características físico-químicas e sensoriais satisfatórias e que oferecesse, ao mesmo tempo, uma alta biodisponibilidade de ferro. Para isso, foram avaliadas os efeitos da adição de diversas dosagens de ferro aminoácido quelato ao leite pasteurizado, homogeneizado, ou não, em comparação com sulfato ferroso.

Desta forma, visou-se oferecer à indústria uma tecnologia viável de enriquecimento do leite fluído com ferro de alta biodisponibilidade, obtendo-se um produto final de boa qualidade, com baixo custo, adequado para utilização em programas institucionais de suplementação alimentar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Importância do ferro na dieta humana*

Desde 1860, o ferro é considerado como um nutriente essencial para animais. No início do século XX, houve um grande interesse pelos estudos de absorção e excreção de ferro, apesar de as técnicas utilizadas para análise serem tediosas. Por volta de 1920, produziu-se um modelo animal para estudo da anemia ferropriva, por meio da alimentação de ratos com uma dieta de leite. O interesse pelo ferro e pela anemia ferropriva continua na atualidade e, apesar de existirem mais informações sobre o ferro do que qualquer um dos outros micro minerais, há ainda questões e problemas não-solucionados (KRAUSE e MAHAN, 1993).

O ferro é encontrado em todas as células dos seres vivos, tanto vegetais quanto animais. É constituinte de várias proteínas complexas, envolvidas no processo de respiração celular e na síntese de DNA. No ser humano, a maior parte, cerca de 60 a 70%, é integrante da hemoglobina, transportadora de oxigênio nos glóbulos vermelhos; de 10 a 12% estão na mioglobina; e de 16 a 29% estão nas formas de ferritina e hemossiderina, armazenados no fígado, no baço e na medula óssea, que constituem o ferro

de reserva ou não-essencial (KRAUSE e MAHAN, 1993 e ANGELIS e CTENAS, 1993).

GUTHRIE (1975) resumiu as funções do ferro em seu livro "Introductory Nutrition". Segundo o autor, existe considerável evidência de que o ferro é importante em diversas funções, muitas destas associadas com a formação sangüínea e transporte de oxigênio. Estas funções incluem a conversão catalítica de beta-caroteno para vitamina A; a síntese de purinas, parte integrante do ácido nucléico; transporte de lipídios no sangue; síntese de colágeno; produção de antibiótico; e desintoxicação de drogas no fígado.

O ferro participa do transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e do transporte de CO₂ das células para os pulmões. Estas duas funções são exercidas pela hemoglobina nos eritrócitos. A mioglobina da célula muscular tem uma função similar à da hemoglobina. Os citocromos presentes em todas as células participam do processo de respiração celular, funcionando como transportadores de elétrons pela oxidação e pela redução do ferro ($Fe^{++} \leftrightarrow Fe^{+++}$).

Estudos da função do ferro como agente anti-infeccioso sugerem que, embora o ferro seja necessário para o crescimento de microrganismos, ele é um componente essencial de enzimas e imuno-substâncias necessárias para destruir organismos invasores infecciosos. A lactoferrina, presente no leite materno, é especialmente efetiva contra *E. coli* no trato gastrointestinal de crianças (ASHMEAD, 1989).

2.2. *Absorção, transporte e armazenamento do ferro*

Existem dois tipos de ferro, de acordo com seu mecanismo de absorção: ferro hemínico (ou heme) e ferro não-hemínico (ou não-heme). O ferro heme encontra-se na estrutura do anel porfirínico, ligado a hemoglobina e à mioglobina, representando cerca de 40% do ferro do tecido animal (Crichton, citado por ANGELIS e CTENAS, 1993).

O ferro heme tem elevada absorção e não sofre influência de fatores que interferem na absorção do não-hemínico, como a ionização e a capacidade de se ligar a outras substâncias. As duas formas de ferro constituem microrregiões distintas de absorção no trato gastrointestinal. O ferro hemínico é absorvido como um complexo ferro porfirínico, diretamente, para as células da mucosa do intestino, por vias diferentes do não-hemínico (ANGELIS e CTENAS, 1993).

De acordo com KRAUSE e MAHAN (1993), num indivíduo sem suplementos de ferro, pode ser esperada uma absorção de, aproximadamente, 35% do ferro heme e 8% do ferro não-heme, na presença dos fatores que aumentam sua absorção.

COOK (1990) estudou a absorção intestinal de ferro em indivíduos normais e deficientes, após a ingestão de ferro hemínico e não-hemínico. A absorção de ferro hemínico para indivíduos do sexo masculino normais foi de 19% contra 46%, em indivíduos deficientes do mesmo sexo. Para ferro não-heme, os valores foram de 2,5% e 22% para indivíduos normais e deficientes, respectivamente.

No duodeno, dada a alcalinidade do meio, os sais inorgânicos de ferro têm sua absorção prejudicada, em decorrência da precipitação na forma de hidróxido de ferro insolúvel. No estômago, por ação do HCl e das enzimas, ocorre uma ionização destes compostos, que liberam os seus radicais constituintes. No estado iônico, os minerais tornam-se instáveis e um grande percentual destes (de 70 a 99,5%) reagem com elementos comuns na alimentação, como o ácido fítico, o ácido oxálico, as fibras, as gorduras, entre outros, tornando-os inaproveitáveis pelo organismo (ASHMEAD et al., 1994).

Substâncias tais, como o tanino e os polifenóis (encontrados no chá e no café); fosfatos, como os fitatos nos cereais; fibras alimentares, principalmente celulose, hemicelulose e lignina; proteínas (albumina e fosfitina do ovo), além de outros elementos inorgânicos, como cálcio

manganês, cobre, cádmio e cobalto são agentes inibidores da absorção de ferro. Ao contrário, certos ácidos orgânicos (ascórbico, cítrico, láctico, málico e tartárico), álcool e aminoácidos, como cisteína, lisina e histidina, favorecem a absorção de ferro (ANGELIS e CTENAS, 1993).

Após absorção no trato gastrointestinal, o ferro liga-se a transferrina, uma glicoproteína responsável pelo transporte do ferro no organismo. A taxa, na qual o ferro é liberado das células mucosas para a circulação geral, é regulada pela quantidade e pela saturação da transferrina. Normalmente, apenas um terço da transferrina está saturada de ferro. Em indivíduos normais, a transferrina permanece saturada, ocorrendo menor absorção e maior perda de ferro nas células da mucosa, por descamação. Já nos indivíduos deficientes, a transferrina é menos saturada e mais ferro passa da célula da mucosa para a transferrina. O contrário acontece nos que têm acúmulo de ferro, ou seja, a absorção é limitada e a excreção é elevada (COOK et al., 1992 e KRAUSE e MAHAN, 1993).

Ao alcançar a superfície das células, o complexo transferrina-ferro liga-se a receptores específicos e o ferro penetra nas células, por meio da formação de “receptosomas”. A transferrina libera o ferro, transforma-se em apotransferrina e volta para a superfície celular, retornando, em seguida, à circulação, continuando então o seu ciclo (ANGELIS e CTENAS, 1993).

Aproximadamente, de 200 a 1.500 mg de ferro estão armazenados no organismo, na forma de ferritina e hemossiderina, sendo 30% no fígado, 30% na medula óssea e o restante no baço e nos músculos. Cerca de 50 mg, por dia, podem ser mobilizados destas reservas de ferro. A concentração de ferritina plasmática reflete as reservas corporais de ferro e é um instrumento inestimável para avaliação clínica do nível de ferro (KRAUSE e MAHAN, 1993).

2.3. Prevalência e caracterização da deficiência de ferro

A deficiência de ferro é um problema nutricional com grande prevalência no mundo inteiro, afetando cerca de um bilhão de pessoas. Em alguns países desenvolvidos, a deficiência de ferro tem sido encontrada em 30 a 50% de toda população. Os grupos, considerados mais, freqüentemente como de maior risco, são crianças abaixo de dois anos de idade, meninas e adolescentes, gestantes e idosos (SPOLIDORO, 1994).

No Brasil, a anemia ferropriva tem sido considerada um inquestionável problema de saúde pública, por se manifestar de forma endêmica: a prevalência média no País é de 40%, atingindo principalmente gestantes, crianças e adolescentes (BRASIL, 1986).

SIGULEM et al. (1978) encontraram uma prevalência de anemia ferropriva de 22,7%, no Município de São Paulo, numa população estudada de 278 crianças de seis a 60 meses. Outra observação, neste estudo, foi que em crianças de até dois anos de idade a inadequação de ferro da dieta independe da renda familiar, sendo inerente ao padrão alimentar próprio da idade, que dificilmente preenche as recomendações, preconizadas para este grupo etário.

Estudos realizados em duas creches, no Município de Viçosa-MG, demonstraram uma prevalência de anemia ferropriva, em torno de 62,5%, para meninos e 44% para meninas, na faixa etária de três a quatro anos. Para idade de quatro a cinco anos, os percentuais foram 83,3% e 62,5%, respectivamente. Em crianças de cinco a seis anos, 50% eram anêmicas, independente do sexo (MAGALHÃES e SILVA, 1993).

Pesquisas, realizadas nos EUA e em outros países, identificaram a anemia por deficiência de ferro, como o maior prejuízo à saúde e à capacidade de trabalho, nos adultos, e, como consequência, uma perda econômica para o indivíduo e para o País (KRAUSE e MAHAN, 1993).

Embora a deficiência de outros nutrientes (cobre, ácido fólico e vitamina B12) sejam também responsáveis pela instalação da anemia, o

ferro é o mais importante em saúde pública, por determinar cerca de 90% das anemias (SPOLIDORO, 1994).

A deficiência nutricional de ferro ocorre, quando a quantidade absorvida da dieta é insuficiente para alcançar as exigências normais. As necessidades abrangem as perdas obrigatórias do organismo e as necessidades nutricionais, para o crescimento (ANGELIS e CTENAS, 1993).

Essa deficiência de ferro pode ser classificada como segue:

- Deficiência sem anemia: é quando existe baixo armazenamento de ferro (baixos níveis de ferritina e hemossiderina), baixa concentração plasmática, aumento da capacidade de ligar ao ferro (aumento da transferrina livre) e valores normais de hemoglobina.
- Deficiência com anemia: é consequência do agravamento do estado anterior, inexistindo armazenamento e sendo baixos os valores relativos à hemoglobina.

De acordo com KRAUSE e MAHAN (1993), a anemia ferropriva é o resultado final de uma carência, que exaure os estoques de ferro, ou seja, o suprimento de ferro é inadequado para sustentar uma eritropoiese (formação de hemáceas) normal, caracterizando-se, por baixa concentração de hemoglobina, e os eritrócitos tornam-se menores (microcíticos) e com menor conteúdo de hemoglobina (hipocrômicos). A deficiência pode ser causada por ingestão inadequada de ferro, absorção deficiente, utilização imperfeita, perda crônica de sangue, ou aumento das necessidades, como na infância, na adolescência e na gravidez.

Os sintomas não são específicos para a deficiência de ferro e incluem, dentre outros, dor de cabeça, fadiga, alterações de apetite, distúrbios vasomotores, câimbras musculares, redução da capacidade de trabalho, dispnéia, palpitação e redução da capacidade de manter a temperatura corporal em ambiente frio.

Os sinais mais freqüentes da deficiência de ferro são: o aumento do débito cardíaco a maior velocidade de captação de O₂ do sangue arterial, a diminuição da capacidade de trabalho aeróbico e físico, a redução na capacidade de concentração, principalmente em crianças e a maior dificuldade para decifrar situações confusas por parte de crianças, com valores da hemoglobina inferiores a 10 g/dl (ANGELIS e CTENAS, 1993).

2.4. Exigências, recomendações e fontes minerais e dietéticas de ferro

Uma exigência fisiológica de ferro pode ser definida, como a quantidade do ferro de origem alimentar biodisponível, que o indivíduo deve absorver, diariamente, para satisfazer suas necessidades fisiológicas (homeostase). A manutenção do processo de absorção juntamente com a necessidade de ferro corpóreo regulam o balanço nutricional de ferro (ANGELIS e CTENAS, 1993).

As quantidades de ferro, que devem ser absorvidas, diariamente, para indivíduos de diferentes idades e sexo, são mostradas no Quadro 1.

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 e, na mulher, na idade fértil, na gravidez e na lactação. As recomendações do NRC estão no Quadro 2 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989).

Tanto o leite humano quanto o de vaca contém apenas de 0,5 a 1,0 mg de ferro, por litro, taxa insuficiente para fazer do leite uma boa fonte de ferro. Esta concentração é equivalente a cerca de 1 mg de ferro por 1.000 Kcal no leite. Fígado e outras vísceras, carne de boi, gema de ovo, cereais integrais, algumas frutas frescas, ou secas, folhas verdes,

Quadro 1 - Quantidade de ferro que deve ser absorvida diariamente para manter a homeostase

Categoria	Quantidade
Lactentes de 0 a 4 meses	0,5 mg
Lactentes de 5 a 12 meses	0,7 mg
Crianças de 1 a 12 anos	1,0 mg
Garotos de 13 a 16 anos	1,8 mg
Garotas de 13 a 16 anos	2,4 mg
Homens	0,9 mg
Mulheres	1,8 mg
Mulheres em idade fértil	2,8 mg
Primeira metade da gravidez	0,8 mg
Segunda metade da gravidez	3,0 mg
Lactação	2,4 mg

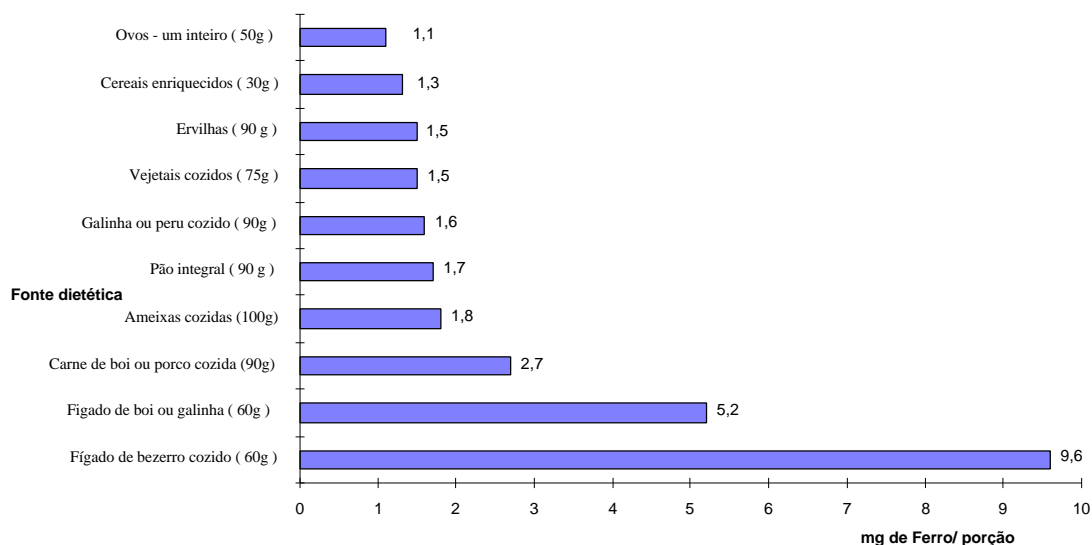
Fonte: Fao (1970), citado por CHAUD, 1993.

Quadro 2 - Recomendações diárias de ferro

Categoria	Idade	Recomendações diárias
crianças	de 0 a 6 meses	6 mg
	de 6 meses a 10 anos	10 mg
homens	de 11 a 18 anos	12 mg
	> 19 anos	10 mg
mulheres	de 11 a 50 anos	15 mg
	> 51 anos	10 mg
gravidez		30 mg
lactantes		15 mg

Fonte: NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989.

leguminosas, nozes e melado contêm quantidades apreciáveis de ferro (KRAUSE e MAHAN, 1993). A Figura 1 mostra alguns alimentos ricos em ferro.



Fonte: KRAUSE e MAHAN, 1993.

Figura 1 - Quantidades de ferro em porções médias de vários alimentos.

O sucesso da fortificação com ferro depende tanto do composto, a ser utilizado, quanto do veículo ao qual vai ser adicionado. A fortificação de alimentos com ferro é, tecnicamente, mais difícil, em relação a outros nutrientes, principalmente porque as formas mais absorvidas são muito reativas e produzem efeitos indesejáveis, quando acrescentadas ao alimento. Sais ferrosos solúveis produzem mudanças de cor, por formarem complexos com compostos sulfurados, taninos, polifenóis e outras substâncias presentes na dieta. Compostos reativos de ferro catalisam reações oxidativas, que resultam em sabor, odor e cor indesejáveis. Substâncias de alta densidade, como ferro elementar, podem exigir

medidas especiais para uma distribuição uniforme e estável (COOK e REUSSER, 1983).

A composição estrutural do sal, ou mineral, influi muito na escolha da fonte de ferro, a ser utilizada no enriquecimento de alimentos, assim como o custo, a solubilidade, a reatividade, a granulometria, a cor, o gosto, a densidade e o cheiro. A biodisponibilidade é também de grande importância nesta avaliação. O Quadro 3 mostra algumas fontes de ferro e os fatores principais, a serem considerados na escolha de um mineral para enriquecimento de alimentos (RUSIG, 1994).

Quadro 3 - Fontes de ferro para fortificação de alimentos e algumas características principais

Produto	Valor biológico relativo ao sulfato ferroso (100)	% Ferro	Custo por grama de ferro biodisponível	Solubilidade	Gosto	Cor
Sulfato ferroso	100	32	Baixo	Levemente solúvel	Ruim	-
Ferro reduzido	36-76	96-98	Baixo moderado	Insolúvel	Ausente	+
Ortofosfato férrico	6-46	28	Alto	Baixa	Leve	-
Pirofosfato de sódio e ferro	13	14	Alto	Insolúvel	Leve	-
Fumarato ferroso	95	32	Moderado	Baixa	Leve	+
Gluconato de ferro	17	12	Alto	Solúvel	Leve	+
Pirofosfato de ferro	45	24	Moderado	Baixa	Leve	+
Citrato de ferro e amônio	100	16	Alto	Solúvel	Leve	+
Citrato férrico	73	17	Alto	Solúvel	Leve	+
Citrato ferroso	76	21	Alto	Baixa	Leve	-

Cor: (+) pronunciada (-) Leve.

Fonte: RUSIG, 1994.

O sulfato ferroso é a forma mais largamente utilizada, como suplementação durante a gravidez, ou como tratamento de diversas formas de anemias, por deficiência de ferro. Apresenta maior biodisponibilidade do que os sais férricos, mas é inferior aos quelatos de ferro. O uso de

ferros-quelatos proporciona melhores resultados quanto à absorção, em virtude da resistência à liberação da forma iônica do metal, por decomposição na via gástrica (CARDOSO et al., 1970).

Em estudos sobre biodisponibilidade, realizados em crianças anêmicas, demonstrou-se que a absorção do ferro foi de 75% na forma de aminoácido quelato, contra apenas 27% quando se utilizou sulfato ferroso. Em indivíduos não-anêmicos, estes valores foram de 15% e 4%, respectivamente (Pineda, citado por ASHMEAD et al., 1994).

2.5. Prevenção ou tratamento da deficiência de ferro

Em países como o Brasil, onde as deficiências alimentares são freqüentes, o problema da anemia ferropriva assume ainda maior importância. Portanto, sua prevenção, ou tratamento, deve assumir uma função estratégica, em termos de saúde pública.

O tratamento imediato da anemia ferropriva é feito pela reposição dos estoques de ferro no organismo. Para isso, recomenda-se a administração oral de sais ferrosos, sendo o sulfato ferroso o mais utilizado. A utilização de sais de ferro, apesar de mais bem absorvido, quando ingerido isoladamente, pode provocar efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, desconforto epigástrico, distensão gástrica, pirose, diarreia, ou constipação. As doses por via oral, recomendadas em mg de ferro/dia para o tratamento da anemia ferropriva, são: sulfato ferroso 240, gluconato ferroso de 160 a 240, fumarato ferroso 264 e sulfato de ferro glicina 200 mg (ANGELIS e CTENAS, 1993).

A administração preventiva de sais de ferro a grupos de riscos é feita pelo uso de 20 a 30 mg de ferro elementar/dia. Esta alta quantidade (de duas a três vezes, o RDA para um adulto de sexo masculino) é devida à baixa biodisponibilidade de ferro nas formulações (SELIGMAN et al., 1983).

O enriquecimento ou fortificação de alimentos básicos, como meio de prevenir o desenvolvimento desta deficiência nutricional, tem sido citado e recomendado por vários autores, como uma estratégia eficaz para melhorar a qualidade da dieta individual e familiar. Além disso, o enriquecimento de alimentos minimiza os efeitos colaterais apresentados pela administração oral de sais de ferro.

2.6. Enriquecimento de alimentos com ferro

O ser humano, por diversos fatores, tem alterado seu hábito alimentar. Aliado a isso, as variações naturais dos alimentos têm influenciado na saúde da população, em muitos casos, pela ingestão deficiente de determinados nutrientes (CARVALHO, 1994).

No Brasil, apesar da evolução positiva do quadro de desnutrição nos últimos 20 anos, permanecem, paradoxalmente, carências nutricionais básicas, tais como: energético-protéica e minero-vitamínica com ênfase ao ferro, ao iodo e à vitamina A. Estas deficiências são justificadas pela baixa ingestão quantitativa de alimentos, principalmente de origem animal, pela má qualidade da dieta e por hábitos alimentares restritos, ou errôneos (SPOLIDORO, 1994).

Várias experiências têm demonstrado que o enriquecimento, ou fortificação de alimentos, consumidos em larga escala pela população, tem sido a forma mais eficiente no combate a esta inadequação nutricional, a um custo compensatório.

A legislação brasileira considera enriquecido todo alimento ao qual for adicionado nutriente, com o objetivo de reforçar seu valor nutritivo, seja repondo, quantitativamente, aqueles destruídos, durante o processamento do alimento, seja suplementando-os com nutrientes em nível superior ao seu conteúdo normal. Especifica, ainda, que para o alimento ser considerado enriquecido, ele deve conter 60% do valor recomendado, segundo o “Recommended Dietary Allowances” (BRASIL, 1978).

Apesar de não existirem diferenças, do ponto de vista tecnológico, várias terminologias têm sido empregadas para definir a adição de nutrientes nos alimentos. Estes procedimentos podem ser definidos, de acordo com a OMS/FAO (1984), citada por SPOLIDORO, 1994, em:

- padronização: adição de nutrientes para compensar as variações naturais dos alimentos;
- reposição: compensação de perdas ocorridas durante o processamento e a estocagem dos alimentos;
- enriquecimento : adição dos nutrientes já presentes no alimento, mas em quantidade insuficiente;
- fortificação: adição de nutrientes que normalmente não estão presentes no alimento.

A OMS/FAO, citada por ARAÚJO (1994), estabeleceu os princípios gerais para adição de nutrientes essenciais aos alimentos. Portanto, ao enriquecer um novo produto, ou criar um programa que atinja uma camada substancial da população, alguns critérios devem ser seguidos:

1. O alimento escolhido deve fazer parte da dieta do grupo a que se pretende atingir, ou seja, não deverão ser mudados os hábitos alimentares.
2. Os nutrientes essenciais deverão estar presentes nos alimentos, dentro de um nível adequado.
3. As quantidades de nutrientes deverão ser suficientes para corrigir, ou prevenir a deficiência nos casos, em que as quantidades de alimentos, consumidos pela população, sejam normais.
4. A adição de um nutriente ao alimento não deverá influir no metabolismo de outros nutrientes.
5. Os nutrientes, adicionados ao alimento, devem ser suficientemente estáveis ao armazenamento, à distribuição e ao uso.
6. O nutriente deverá ser biologicamente disponível.

7. O nutriente não deverá agregar características indesejáveis aos alimentos, como odor, gosto, textura, ou modificar as propriedades de cocção.
8. A tecnologia e as instalações utilizadas devem permitir a adição de nutrientes, de maneira satisfatória.
9. O custo adicional do alimento enriquecido deverá ser acessível ao consumidor.
10. Deverão ser utilizados métodos para medir e controlar o nível de nutrientes, adicionados ao alimento.

Segundo ARAÚJO (1994), o enriquecimento de alimentos oferece benefícios nutricionais consideráveis e é a forma mais viável de enfrentar alguns dos problemas nutricionais de uma população. O autor refere-se ao enriquecimento de alimentos, como uma das propostas para concretização das resoluções, tomadas durante a Conferência Internacional de Nutrição, sob os auspícios da FAO-OMS, realizada em dezembro de 1992, em Roma. Neste evento, a eliminação da carência de ferro até o ano 2000 figura entre as metas destas resoluções.

O grave problema das anemias e suas repercussões no crescimento e no desenvolvimento de crianças levaram o Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição - INAN/MS - a apresentar, em 1991, uma proposta de combate à anemia, a ser aplicada em todo Brasil. Os principais itens desta proposta foram:

- Fortificação de alimentos específicos e de uso habitual pela população alvo, tais como: leite, amido de milho, farofa, fórmulas infantis, açúcar e biscoitos.
- Avaliação do programa de fortificação, sugerindo a concentração de hemoglobina e de protoporfirina, como parâmetros hematológicos de avaliação, com medidas no início do programa e a cada 3 meses.

Contudo, existem dificuldades em estabelecer padrões, em função das variações na absorção e no consumo dietéticos das diferentes regiões e dos grupos populacionais, que influenciam a disponibilidade de ferro (BRASIL, 1991).

Conforme recomendações do INAN, as intervenções no combate à anemia ferropriva devem conter, além da suplementação de ferro, a preocupação com a eliminação das infestações parasitárias, da educação sanitária e nutricional e das medidas de saneamento básico (BRASIL, 1991).

Vários países tornaram o enriquecimento com ferro obrigatório nas farinhas de trigo, de arroz, ou nos derivados de trigo (pão e massas). Entre os países, estão Inglaterra, Chile, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá, Porto Rico, Índias Ocidentais e República Dominicana (SPOLIDORO, 1994).

2.7. Adição de ferro em leite e derivados

Os produtos lácteos são apreciáveis fontes de proteínas, cálcio, vitaminas e outros nutrientes, porém são pobres em vitamina C e ferro.

O ferro no leite é principalmente encontrado, ligado à caseína, à membrana do glóbulo de gordura e como constituinte da lactoferrina. O conteúdo médio de ferro no leite bovino é de, aproximadamente, 0,5 mg/litro (Quadro 4). O leite de vaca não é apenas uma fonte pobre de ferro, mas contém este elemento numa forma pouco disponível e, em algumas crianças, sua ingestão está associada com hemorragias intestinais. A incidência e a gravidade dessas hemorragias agravam ainda mais o quadro de anemia ferropriva, durante o primeiro ano de vida. Esta patologia pode ser diminuída, pela redução na ingestão de leite fresco, que não deve ultrapassar a 750 ml/dia, após os seis meses de vida. Isto favorece uma dieta mais variada, que inclua alimentos fortificados (DALLMAN et al., 1980).

Quadro 4 - Conteúdo de ferro em leite e derivados

Produto	Porção	Ferro (mg)
Leite “in natura”	250 ml	0,12
Leite condensado	20 g	0,06
Manteiga	14 g	0,02
Requeijão	10 g	0,03
Iogurte com frutas	100 g	0,24

Fonte: ANGELIS e CTENAS, 1993.

Por ser amplamente consumido, o leite pasteurizado tem-se destacado, como excelente veículo para suplementação de ferro e outros nutrientes à população.

RIVERA et al. (1982), no México, mostraram que o leite é um veículo ideal para administração de ferro e cobre, quando empregado em programas de intervenção nutricional.

No Chile, o Serviço Nacional de Saúde, por meio de um programa de suplementação alimentar de leite em pó, fortificado com 15 mg/kg de sulfato ferroso, promoveu uma redução na prevalência de anemia de 29,9% para 5,5%, em 654 crianças de até 15 meses de idade (STEKEL et al., 1988).

OLIVARES et al. (1989) avaliaram o estado nutricional de lactentes de 3 a 12 meses de idade, que recebiam leite fortificado com ferro. Resultados bioquímicos permitiram concluir que a suplementação foi bastante positiva. Os autores mostraram ainda que 29% dos lactentes que não receberam o leite fortificado desenvolveram anemia ferropriva.

No Brasil, apesar de algumas experiências bem sucedidas, nos últimos 20 anos, ainda não são conclusivos os estudos no sentido de tornar obrigatória e permanente a fortificação de alguns alimentos básicos ou

industrializados destinados à população carente e aos grupos biologicamente vulneráveis, atendidos pelos programas oficiais (SPOLIDORO, 1994).

Em um estudo, para testar a eficácia do enriquecimento do leite com ferro polimaltosado, ANDRADE et al. (1992) evidenciaram que a suplementação de ferro foi capaz de melhorar as condições nutricionais de crianças, mesmo sem interferência direta na dieta .

Em termos de fortificação de leite, a experiência nacional mais recente é a do Estado de São Paulo, cuja prevalência de anemia, em crianças de 6 a 23 meses de idade, é de 59,1%. A Secretaria de Saúde deste Estado, por meio do Grupo de Atenção à Nutrição (GAN), vem utilizando o leite, distribuído gratuitamente, como veículo para enriquecimento com ferro. Num estudo, utilizando leite em pó, enriquecido com sulfato ferroso, a ocorrência de anemia foi reduzida de 72,8% para 18%, em seis meses de uso deste leite (SÃO PAULO, 1994).

Na região de Tupã, no mesmo Estado, o uso de leite fluído, fortificado com ferro, distribuído a crianças carentes, decresceu a prevalência de anemia de 72% para 40%, em 100 dias (COPLAP, 1994).

2.8. Efeitos da adição do ferro ao leite

A adição direta de ferro ao leite é considerada um meio eficiente, para aumentar a ingestão dietética de ferro em uma população. Contudo, este enriquecimento provoca efeitos prejudiciais à sua qualidade e à aceitabilidade (WANG e KING, 1973).

Uma limitação do enriquecimento do leite com ferro é o fenômeno da oxidação da gordura, catalisada por este metal, acompanhada por indesejáveis mudanças no sabor. O efeito catalítico do ferro é maior, quando este se encontra, na forma ferrosa, do que na forma férrica (DEMOTT, 1971, EDMONDSON et al.; 1971, WANG e KING, 1973 e DOUGLAS et al., 1981).

BALDWIN et al. (1982), utilizando ferro reduzido, complexado com ácido fosfórico e ácido cítrico, constataram um significativo incremento no sabor oxidado, quando o ferro foi adicionado após a pasteurização a 72°C, durante 17 segundos, comparado com o tratamento a 80°C, durante 25 segundos. Maior concentração de malonaldeído, no teste de TBA (ácido tiobarbitúrico), foi relacionado com adição de ferro, após pasteurização a 72°C, durante 17 segundos.

DOUGLAS et al. (1981) revelaram que o leite, enriquecido com ferro, geralmente exige técnicas especiais de processamento para prevenir o desenvolvimento de sabor estranho, causado por efeitos catalíticos do ferro, na oxidação da gordura do leite. Para prevenir este defeito, os autores recomendam temperaturas mais elevadas de pasteurização (77°C, durante 16 segundos), quando o leite cru é enriquecido com sais férricos.

WANG e KING (1973) verificaram que a estabilidade oxidativa do leite pasteurizado e homogeneizado foi influenciada pela adição de vários sais de ferro. Neste experimento, o citrato férrico amoniacal, na dosagem de 10 ppm de ferro, mostrou-se tão estável quanto o leite sem adição (controle), após sete dias de estocagem sob refrigeração. Foram comparados os valores do índice de TBA e as médias dos escores para sabor oxidado, definidas por um painel de julgadores treinados. O sulfato ferroso na mesma dosagem foi o mais instável e desenvolveu forte sabor oxidado, após dois dias de estocagem.

O ferro e o cobre, que ocorrem naturalmente no leite, não afetam a oxidação, porque eles estão complexados com proteínas e não são dializáveis no pH normal do leite (BALDWIN et al., 1982).

O uso de quelatos como aditivos é mais vantajoso do que o uso de metais livres, ou sais metálicos. Uma das vantagens refere-se à sua estabilidade. A forma do metal aminoácido quelato permanece inerte, no alimento, que está enriquecendo. O cátion é preso ao ligante, que o isola de reações com outros compostos. O ferro aminoácido quelato comporta-se

em solução, como um dipeptídeo, sendo ionizado somente após sua absorção pelo organismo (ASHMEAD, 1994).

Alguns estudos, citados por RANHOTRA et al. (1981), indicam que o leite e suas fosfoproteínas constituintes, provavelmente, diminuem a absorção de ferro suplementar. No entanto, os mesmos autores, utilizando ferro BioPlex (complexo de ferro ferroso com citrato e fosfato monossódico), adicionado ao leite fluido, relataram que os componentes do leite, aparentemente, não exerceram efeito adverso na biodisponibilidade do ferro.

Segundo ANGELIS e CTENAS (1993), a caseína inibe a absorção de ferro, por ligar-se a este elemento, por meio do grupo serina-fosfato e fosfopeptídios, sendo esta uma das causas da menor biodisponibilidade do ferro, oriundo do leite de vaca.

Tendo em vista a freqüência e a gravidade das deficiências nutricionais de ferro, e o fato de o tratamento preferencial das anemia ferropriva com sulfato ferroso apresentar efeitos colaterais freqüentes, graves e de difícil previsão, seria útil o desenvolvimento de compostos alternativos que, adicionados aos alimentos, apresentassem alta biodisponibilidade de ferro e ausência, ou redução de efeitos colaterais, ou adversos (CHAUD, 1993).

Desta forma, o uso de aminoácido quelato de ferro (FERROCHEL), adicionado ao leite fluido, pode preencher os requisitos necessários para ser utilizado em programas estratégicos de prevenção, ou tratamento da anemia ferropriva, principalmente, quando inseridos em políticas de alimentação (programas sociais de distribuição de leite, por exemplo), que concedem prioridade aos grupos vulneráveis da população, tanto do ponto de vista biológico, quanto econômico e social.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido, no Laboratório de Análises Físico-químicas de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde, da Universidade Federal de Viçosa.

Foram realizados três ensaios, que caracterizaram este estudo. Um ensaio de biodisponibilidade do ferro, em que se procurou medir o valor biológico relativo do ferro aminoácido quelato contra o padrão sulfato ferroso, utilizando-se a recuperação dos níveis de hemoglobina em ratos anêmicos. Outro ensaio consistiu em avaliar o efeito da adição de vários níveis de ferro, em algumas propriedades físico-químicas do leite pasteurizado, homogeneizado ou não, ao longo de três dias de estocagem a 5°C. E por fim, uma avaliação sensorial do leite fortificado, em várias dosagens de ferro, analisando-se o desenvolvimento de sabor oxidado no início e no final do tempo de estocagem. O fluxograma, representando os procedimentos experimentais, é mostrado na Figura 2.

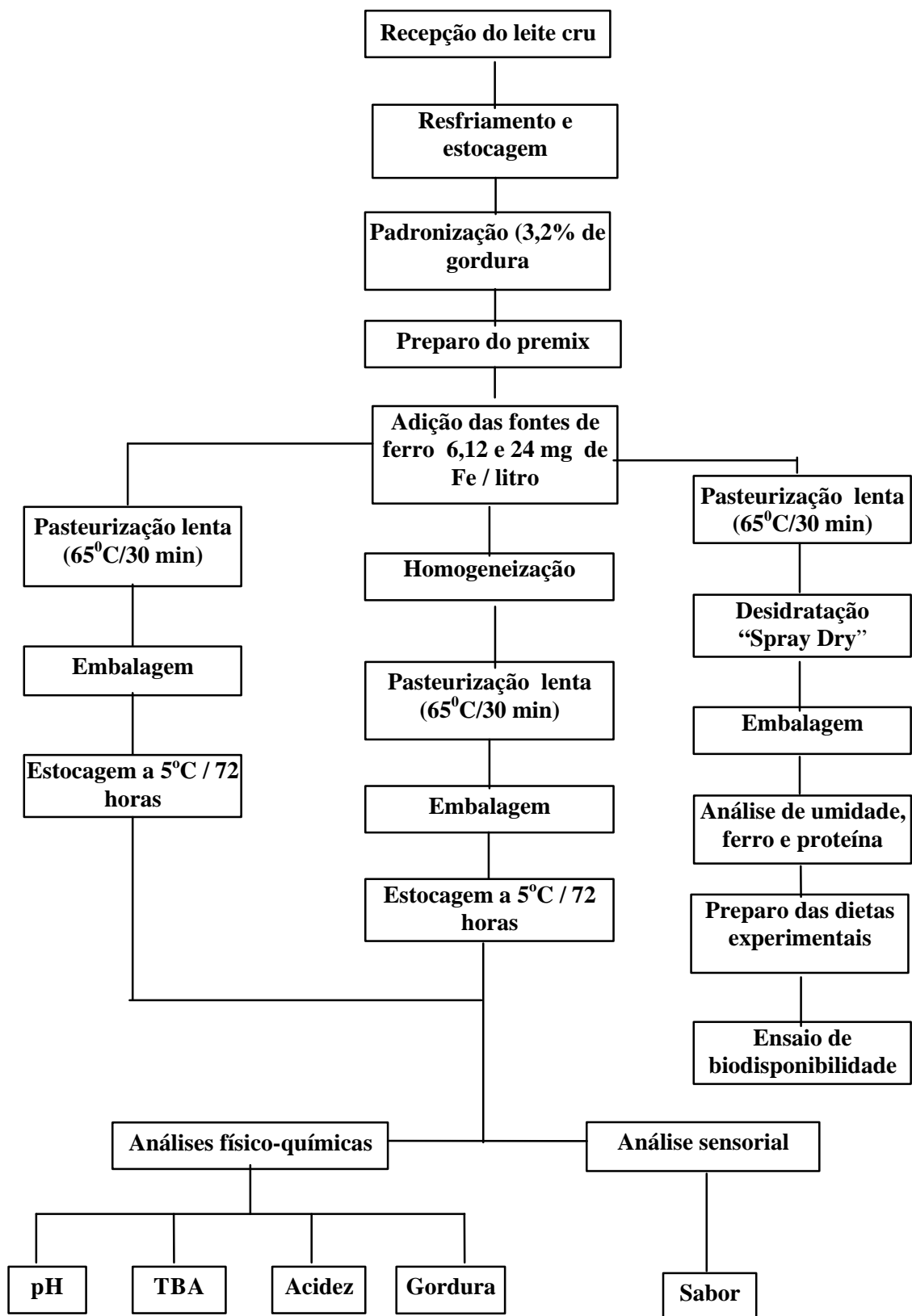


Figura 2 - Fluxograma dos procedimentos experimentais.

3.1. *Preparo das amostras (obtenção do leite enriquecido)*

Duas fontes de ferro foram adicionados ao leite, o ferro aminoácido quelato (Albion Laboratories, Inc. Clearfield-Utah-USA), contendo 20,35% de ferro e o sulfato ferroso (Vetec Com. & Repr.-RJ-BR), contendo 20,01% de ferro nas dosagens de 6, 12 e 24 mg de Ferro/litro. Para melhor solubilização das amostras, foi preparado um premix, dissolvendo-se previamente os compostos de ferro em 500 ml de leite.

As fontes de ferro foram adicionadas ao leite cru tipo C, padronizado a 3,2% de gordura, proveniente do Laticínio-Escola da FUNARBE/UFV. Em seguida foi pasteurizado pelo sistema Low Temperature Long Time (LTLT) a 65°C, durante 30 minutos, em cubas de aço inoxidável. A metade do leite foi homogeneizada a 140,62 kgf/cm², no primeiro estágio, e 35,15 kgf/cm², no segundo estágio. Após a homogeneização, todo leite foi embalado em sacos de polietileno de um litro e estocado, durante um período de três dias, sob refrigeração a 5°C.

Considerando um consumo médio diário de 500 ml, estas doses representam 30, 60 e 120% da recomendação diária necessária (RDA = 10 mg - NRC, 1989). O leite pasteurizado não-enriquecido foi usado como controle (nível zero de ferro adicionado).

Para o ensaio de biodisponibilidade, as amostras de leite, após serem enriquecidas com sulfato ferroso, ou ferro aminoácido quelato, nas dosagens de 6, 12 e 24 mg/l, foram submetidas ao processo de secagem em atomizador “Spray dry” (NIRO ATOMIZER tipo FU11 BAA 06) com temperatura de entrada do ar, em torno de 225±1°C, e temperatura de saída próxima a 94±1°C. Em seguida, foram analisadas em duplicata para o teor de umidade, ferro e proteína, sendo então utilizadas nas preparações das dietas, fornecidas aos animais experimentais.

Os equipamentos, utilizados no processamento desta etapa, foram aqueles normalmente encontrados, numa fábrica de laticínios.

3.2. Ensaio de biodisponibilidade

A metodologia, empregada para a determinação da biodisponibilidade do ferro, foi baseada no modelo de recuperação dos níveis de hemoglobina em ratos anêmicos. Este procedimento experimental foi dividido em duas fases distintas. A primeira, com duração de 28 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 regeneração**).

3.2.1. Procedimentos analíticos

3.2.1.1. Caracterização das dietas

Para melhor caracterização das dietas, foram procedidas análises, em duplicata, da composição físico-química, que constaram dos valores percentuais de umidade, lipídios, proteínas e cinzas.

A umidade das dietas foi determinada por secagem, em estufa, até peso constante, conforme metodologia descrita nos métodos analíticos oficiais do Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA, 1981). O teor de lipídios totais foi obtido por extração com éter etílico em aparelho “Soxleht”, de acordo com procedimento descrito nos métodos oficiais do LANARA (1981).

Foram realizadas determinações do teor de nitrogênio total nas dietas, empregando-se o método de Kjeldahl (AOAC, 1984). Para conversão dos teores de nitrogênio total para percentual de proteína, utilizou-se o fator 6,25. O teor de cinzas foi determinado por incineração

em forno mufla a 550°C, conforme descrito nos métodos analíticos do LANARA (1981).

3.2.1.2. *Determinação do ferro elementar*

As concentrações de ferro no leite e nas dietas foram determinadas após mineralização das amostras por via úmida, utilizando-se mistura digestora nitro-perclórica na proporção de 3:1. Pesou-se 1 grama de amostra em Erlenmeyer de 250 ml e adicionaram-se 15 ml da mistura de ácidos, aquecendo-se até fervura e desprendimento de gases de coloração marrom-avermelhada. Prolongou-se o aquecimento até a solução tornar-se clara. Em seguida, resfriou-se e diluiu-se a solução restante em água destilada e filtrou-se para balões volumétricos e o volume completado para 50 ml. Esta solução de ferro foi então analisada por espectrofotometria de absorção atômica, em espectrofotômetro CG modelo AA 7000 de duplo feixe, no comprimento de onda de 248,7 nm, lâmpada de 7,5 mA e tempo de integração de dois segundos.

3.2.1.3. *Determinação dos níveis de hemoglobina*

As concentrações de hemoglobina foram determinadas pelo método da Cianometahemoglobina (AOAC, 1984), utilizando-se kit para teste colorimétrico de hemoglobina da ANALISA Ind. & Com. LTDA, Belo Horizonte-MG. Neste método, o sangue foi coletado da cauda do animal, após secção de um pequeno segmento, gotejado em placas de vidro e pipetado, rapidamente, com micropipetas de 20 microlitros. O sangue foi então misturado com 5 ml de uma solução de cianeto e ferro cianeto de potássio (solução de Drabkin), que oxida o ferro da hemoglobina, transformando-a em metahemoglobina e, posteriormente, em cianometahemoglobina, cuja concentração foi medida a 540 nm em espectrofotômetro VARIAN modelo 634-S.

3.2.1.4. *Determinação do valor biológico relativo (VBR) do ferro aminoácido quelato*

O valor biológico relativo (VBR) do ferro aminoácido quelato foi determinado pelo método-padrão da AOAC (1984). O VBR é determinado, dividindo-se os coeficientes de inclinação das retas, obtidas pelas médias do ganho de hemoglobina, em função dos níveis de adição de ferro às dietas experimentais.

3.2.2. *Formulação das dietas experimentais*

A composição percentual dos ingredientes, utilizados na preparação da dieta basal, oferecida aos animais na fase de depleção, foi adaptada da AOAC, 1984 e está apresentada no Quadro 5. As composições das misturas vitamínica e mineral são mostradas nos Quadros 6 e 7, respectivamente.

Quadro 5 - Composição percentual da dieta basal oferecida aos ratos na fase de depleção

Ingredientes	g/100g
Caseína	20,0
Mistura vitamínica	1,0
Mistura mineral	3,5
Óleo de soja	5,0
Cloreto de colina	0,2
Amido de milho	65,3
Celulose	5,0
Total	100,0

Fonte: Adaptada da AOAC,1984.

Quadro 6 - Composição percentual dos ingredientes da mistura vitamínica utilizada no preparo das dietas

Ingrediente	Quantidade em 100g
Tiamina - B ₁	60 mg
Riboflavina-B ₂	60 mg
Piridoxina - B ₆	70 mg
D-pantotenato de cálcio	160 mg
Ácido nicotínico	300 mg
Ácido fólico	20 mg
D-Biotina	2 mg
Cianocobalamina-B ₁₂	0,1 mg
Retinil palmitato	600 mg ou 40.000 UI de atividade de vit. A
DL- alfa tocoferol acetato E	500 mg ou 500 UI de atividade de vit. E
Colecalciferol-D	0,25 mg
Menadiona-vit. K	0,5 mg
Sacarose	q.s.p. 100 g

Fonte: Adaptada da AOAC,1984.

Quadro 7 - Composição percentual dos ingredientes da mistura mineral utilizada no preparo das dietas

Ingrediente	Quantidade em 100 g
Fosfato de cálcio dibásico (CaHPO_4)	50 g
Cloreto de cálcio (CaCl_2)	7,4 g
Citrato de potássio monoidratado	22 g
Sulfato de potássio (K_2SO_4)	5,2 g
Óxido de magnésio (MgO)	2,4 g
Sulfato manganoso	0,4 g
Carbonato manganoso - 43-48% Mn	0,35 g
Carbonato de zinco, 70% de ZnO	0,16 g
Carbonato cúprico, 53-55% de Cu	30 mg
Iodato de potássio (KIO_3)	1 mg
Selenito de sódio ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	1 mg
Sulfato de cromo e potássio ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	55 mg
Sacarose	q.s.p. 100 g

Fonte: Adaptada da AOAC, 1984.

As dietas experimentais, utilizadas na fase de regeneração, foram preparadas, adicionando-se à dieta basal o leite em pó enriquecido, contendo as fontes de ferro nas diferentes dosagens. Foram preparadas sete dietas isoprotéicas e isocalóricas, que constituíram os tratamentos: três dietas-referência, contendo leite em pó enriquecido com sulfato ferroso nas dosagens de 6, 12, e 24 mg de ferro/kg de dieta, representando as dietas 1, 2 e 3, respectivamente; e três dietas-teste, contendo leite em pó enriquecido com ferro aminoácido quelato nas dosagens de 6, 12, e 24 mg de ferro/kg de dieta, constituindo as dietas 4, 5 e 6, respectivamente. Foi incluída uma dieta-controle, preparada pela adição à dieta basal, de leite em pó não-enriquecido, cuja quantidade foi baseada no teor de proteína das dietas experimentais, de modo que não diferissem entre si quanto a este nutriente.

A composição destas dietas foi idêntica, exceto para a fonte e a concentração de ferro. A concentração final de ferro para cada dieta foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica, conforme descrito nos procedimentos analíticos.

Os ingredientes de todas as dietas foram misturados, manualmente, em recipientes plásticos e, em seguida, peneirados por quatro vezes. As dietas prontas foram acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas a -18°C .

3.2.3. *Modelo experimental*

- **Fase de depleção**

Setenta ratos machos albinos recém-desmamados da raça Wistar, pesando entre 41 e 55 gramas, com níveis médios de hemoglobina de $14,26 \pm 0,68$ g/100 ml, foram colocados, individualmente, em gaiolas de aço inoxidável, em sala separada, sob ambiente controlado, mantido a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro-escuro de 12 horas. Foram então submetidos à dieta Basal (contendo 18,5 ppm de ferro), durante 28 dias. Após este período, o sangue foi coletado por gotejamento, após incisão da porção terminal da cauda e a hemoglobina, dosada pelo método da cianometahemoglobina. Dieta basal e água deionizada foram oferecidas “ad libitum”. Durante esta fase, o peso dos ratos e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente.

- **Fase de regeneração**

Nesta fase, 64 animais anêmicos (cujo nível de hemoglobina estava abaixo de 6 g/100 ml de sangue) foram selecionados, dentre os 70 iniciais, e divididos em oito grupos de oito animais/grupo, baseado no peso e no nível de hemoglobina, no final da fase de depleção. Este procedimento foi

sistematizado, de forma a obter-se menor variação intra e intergrupos. Um grupo continuou recebendo a dieta basal. Os grupos restantes foram submetidos às sete dietas experimentais, que constituíram os tratamentos. O estudo dos níveis de regeneração da hemoglobina teve duração de 14 dias e a hemoglobina foi medida no sétimo e no décimo quarto dias. Durante esta fase, o ganho de peso e o consumo de dieta foram também registrados.

3.3. *Análises físico-químicas*

3.3.1. *Acidez titulável*

A acidez titulável do leite, expressa em graus Dornic, foi determinada, conforme descrita pelo Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA, 1981), titulando-se 10 ml das amostras com uma solução de hidróxido de sódio N/9, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

3.3.2. *pH*

O pH das amostras foi determinado com auxílio de um potenciômetro, aferido com soluções-tampão padronizadas, de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1984).

3.3.3. *Teor de gordura*

O teor de gordura foi analisado com uso do butirômetro de Gerber, conforme descrito nos métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes (LANARA, 1981).

3.3.4. *Efeito na oxidação da gordura (índice de TBA)*

A análise dos produtos secundários de oxidação da gordura foi realizada pelo índice de TBA (ácido tiobarbitúrico), conforme descrito por KING (1962). O teste é baseado na reação entre malonaldeído, produzido durante a oxidação de ácidos graxos insaturados e ácido tiobarbitúrico, que formam um pigmento róseo avermelhado, mensurável por espectrofotometria a 532 nm, e os resultados expressos em absorvância. O procedimento deste teste é descrito a seguir.

Foram pipetados 17,6 ml de leite e colocados diretamente, em tubo de vidro de 25 ml com tampa. Aqueceu-se a 30°C e foram adicionados 1 ml de ácido tricloroacético (1g/ml) e 2 ml de etanol 95%. Fechou-se e, manualmente, agitou-se vigorosamente o tubo durante 10 segundos. Após 5 minutos, em repouso, à temperatura ambiente, filtrou-se o conteúdo em papel-filtro Whatman 42. Foram coletados 4 ml do filtrado claro, adicionou-se 1 ml da solução de TBA a 1,4% em etanol a 95%, foram misturados os conteúdos e aquecidos, em seguida, em banho-maria a 60°C, durante uma hora. Resfriou-se e então procedeu-se à leitura a 532 nm em espectrofotômetro VARIAN modelo 634-S, usando-se água destilada como referência.

3.4. *Análise sensorial*

Amostras de leite de todos os tratamentos foram analisadas, sensorialmente, por um painel de seis provadores treinados, utilizando-se um método descritivo, com uso de escala estruturada, de acordo com técnica descrita por CHAVES (1993). A seleção e o treinamento dos candidatos, que participaram do painel de julgadores, foram feitas, utilizando-se teste descritivo, no qual determinou-se a habilidade dos participantes, em medir diferenças no sabor oxidado, e a reprodutibilidade dos resultados. A escala de categoria e as variações simuladas foram as

mesmas, utilizadas no teste sensorial das amostras de leite enriquecido (CHAVES, 1990).

A realização de um teste-piloto determinou o final da avaliação dos julgadores e o término do treinamento. O teste consistiu em oferecer aos julgadores três diferentes amostras de leite, sendo uma delas não-enriquecida (controle) e as outras duas, enriquecidas com sulfato ferroso (24 mg/l) e ferro aminoácido quelato na dosagem de 6 mg/l. As amostras foram oferecidas em duplicatas, procedendo-se duas repetições do teste, num total de 12 análises por julgador.

A avaliação sensorial consistiu em apresentar aos julgadores uma seqüência das amostras, devidamente codificadas, solicitando-se ao provador que degustasse a amostra e assinalasse a posição da escala, que melhor refletia o seu julgamento da intensidade do sabor oxidado. Isto foi feito para cada amostra, de acordo com uma escala estruturada de sete pontos, de muito pronunciado até imperceptível, conforme a ficha de avaliação fornecida (Figura 3). A avaliação sensorial foi realizada, no início, logo após o preparo da amostra (tempo zero) e ao final de 72 horas de estocagem.

As classificações da escala foram transformadas em valores numéricos de zero a seis e analisadas, estatisticamente, utilizando-se a técnica da Análise de Variância.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANÁLISE SENSORIAL - FICHA DE AVALIAÇÃO

ANÁLISE DO SABOR

Nome _____ Data _____

Deguste as amostras de leite apresentadas e assinale o ponto da escala que melhor reflita a sua percepção de intensidade de **sabor metálico (oxidado)**, para cada amostra codificada.

	Código da amostra						
	151	287	900	025	504	322	756
Muito pronunciado	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Moderadamente pronunciado	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Levemente pronunciado	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Perceptível	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Moderadamente perceptível	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Levemente perceptível	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imperceptível	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Comentários	_____ _____						

Figura 3 - Modelo de ficha para análise sensorial do leite enriquecido com ferro aminoácido quelato e sulfato ferroso, em vários níveis de adição.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Ensaio de biodisponibilidade*

4.1.1. *Caracterização físico-química do leite enriquecido e das dietas experimentais*

As amostras de leite em pó, enriquecido com ferro, usadas na preparação das dietas experimentais, foram caracterizadas quanto à sua composição físico-química, cujos resultados são mostrados no Quadro 8. A composição físico-química das dietas é apresentada no Quadro 9. As concentrações de umidade, proteína e cinzas das dietas não diferiram entre si. O teor de gordura para a dieta basal foi, ligeiramente, inferior às demais, por não conter leite em pó em sua constituição. As diferentes concentrações de ferro, determinadas nas dietas experimentais, correspondem aos níveis de ferro, adicionados na forma de leite em pó enriquecido.

Quadro 8 - Composição físico-química das amostras de leite em pó enriquecido com ferro, usadas na preparação das dietas experimentais

Amostra (fonte)	Ferro adicionado* (mg/l)	Ferro** determinado (mg/kg)	Umidade (g/100 g)	Proteína (g/100 g)
Controle	0	1,1	4,47	24,91
Sulfato ferroso	6	48,5	3,70	25,36
	12	85,4	2,96	25,96
	24	194,4	3,44	26,28
Ferro aminoácido quelato	6	38,2	3,23	26,36
	12	82,9	3,26	26,38
	24	168,6	3,77	25,33

* Nível de ferro adicionado ao leite fluido.

** Teor de ferro determinado no leite em pó.

Quadro 9 - Composição físico-química das dietas experimentais

Dieta	Umidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)	Ferro adicionado (mg/kg) *	Ferro determinado (mg/kg)
Basal	9,02	4,8	17,1	3,23	0	18,5
Controle	7,42	8,2	18,8	3,83	0	13,9
Dieta 1 (SF)	7,63	7,9	17,9	3,90	6	28,5
Dieta 2 (SF)	7,19	7,9	18,9	3,98	12	34,3
Dieta 3 (SF)	7,37	7,5	18,2	3,95	24	42,3
Dieta 4 (FAQ)	7,15	8,3	18,8	3,94	6	26,4
Dieta 5 (FAQ)	7,03	8,1	19,2	3,81	12	35,9
Dieta 6 (FAQ)	7,75	7,5	19,3	3,82	24	42,2

* Níveis de ferro adicionado nas dietas, na forma de leite em pó enriquecido.

SF = sulfato ferroso e FAQ = ferro aminoácido quelato.

4.1.2. Valor biológico relativo do ferro aminoácido quelato

O Quadro 10 mostra os resultados dos níveis e o ganho de hemoglobina, determinados durante a fase de regeneração do ensaio de biodisponibilidade.

Os níveis médios de hemoglobina, obtidos ao final da fase de regeneração, mostram que as dietas, contendo leite enriquecido com ferro, proporcionaram uma regeneração satisfatória dos ratos anêmicos, exceto aquelas que continham teores mais baixos de ferro, cujos níveis de ferro não possibilitaram a recuperação da homeostase de hemoglobina. Os grupos de animais que receberam, durante a fase de regeneração, dietas contendo 6 mg de ferro por kg de dieta, de ambas as fontes (dietas 1 e 4), obtiveram níveis de hemoglobina inferiores ao nível inicial, medido no começo da fase de depleção ($11,69 \pm 2,46$ para a dieta 1 e $11,99 \pm 0,93$ para a dieta 4, contra $14,26 \pm 0,68$ g/100 ml para o nível inicial). Verificou-se o mesmo resultado para as dietas-controle e basal, cujos níveis finais de hemoglobina atingiram 9,08 e 9,81 g/100 ml, respectivamente.

Os resultados, observados para o ganho de hemoglobina, mostram que não houve diferença significativa ($p > 0,01$) entre as fontes de ferro utilizadas, quando comparados em cada nível de adição. As dietas equivalentes quanto ao teor de ferro adicionado promoveram ganhos de hemoglobina semelhantes, independente da fonte utilizada.

A biodisponibilidade do ferro aminoácido quelato, em relação ao sulfato ferroso, foi calculada pelo método-padrão da AOAC (1984). A Figura 4 mostra a recuperação dos níveis de hemoglobina de ratos no estado depletado, em função dos níveis de ferro, determinados nas dietas experimentais. A inclinação da reta é uma indicação da velocidade de regeneração do estado de depleção de hemoglobina para cada dieta-teste.

A biodisponibilidade relativa do ferro aminoácido quelato (FERROCHEL), calculada pela razão entre os coeficientes de inclinação das retas, foi 104%. Apesar de numericamente superior, o FERROCHEL

Quadro 10 - Níveis e ganho de hemoglobina (g/100 ml de sangue) determinados durante a fase de regeneração de ratos anêmicos, submetidos a dietas contendo leite enriquecido com ferro

Nível de Hemoglobina	Hemoglobina no dia 0	Hemoglobina no dia 7	Hemoglobina no dia 14	Ganho de Hemoglobina
Dieta 1	5,06 (± 1,14)	6,83 (± 1,34)	11,69 (± 2,46)	6,63 (±1,74)
Dieta 2	5,09 (± 0,84)	7,60 (± 0,85)	14,59 (± 1,17)	9,62 (±0,80)
Dieta3	5,16 (± 0,81)	9,06 (± 0,49)	17,07 (± 0,75)	11,91 (±1,39)
Dieta4	5,10 (± 0,58)	6,79 (± 1,01)	11,99 (± 0,93)	6,88 (±0,81)
Dieta5	5,14 (± 0,83)	7,10 (± 0,77)	14,35 (± 1,81)	9,33 (±2,12)
Dieta6	4,88 (± 0,98)	9,11 (± 0,85)	16,9 (± 1,05)	12,03 (±0,93)
Basal	4,76 (±0,99)	5,81 (±1,29)	9,81 (±1,92)	5,05 (±1,41)
Controle	5,10 (± 0,71)	5,65 (± 0,86)	9,08 (± 1,37)	3,98 (±1,28)

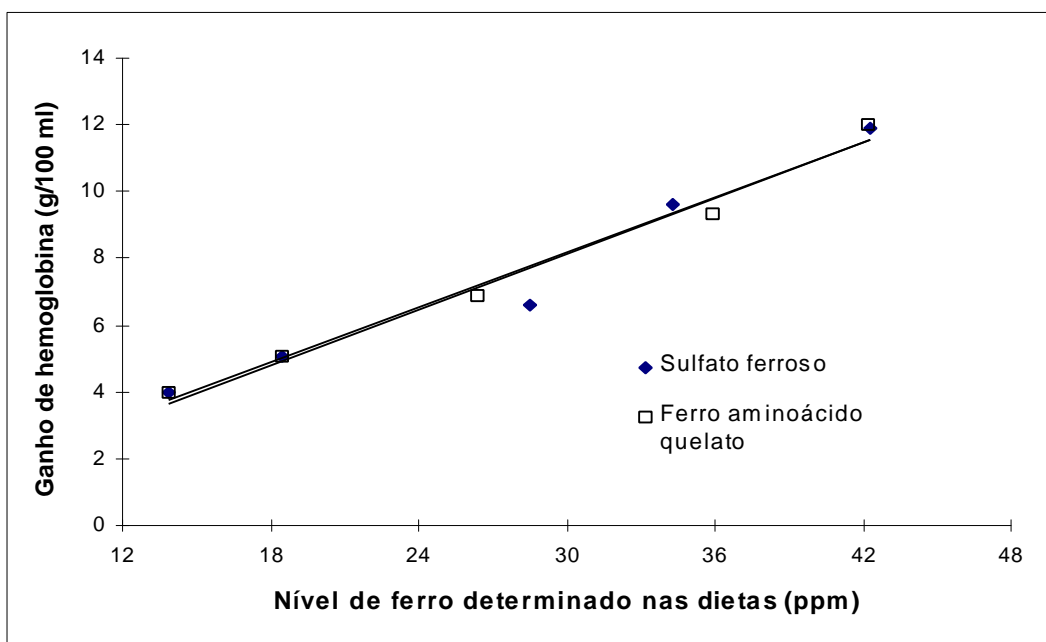


Figura 4 - Análise da biodisponibilidade relativa do ferro aminoácido quelato calculada pela inclinação da reta (método-padrão da AOAC, 1984).

apresentou uma biodisponibilidade, quando adicionado ao leite, que não diferiu estatisticamente ($p > 0,01$) do sulfato ferroso.

Este resultado é consistente com valores de biodisponibilidade relativa, reportados na literatura em ensaios com leite, fortificado com ferro. Vários compostos de ferro, adicionados ao leite, tiveram sua biodisponibilidade relativa, medida por outros investigadores, em diversos experimentos de regeneração dos níveis de hemoglobina em ratos. Alguns destes são mostrados no Quadro 11.

Vale ressaltar, no entanto, que os nossos resultados são discordantes daqueles obtidos, quando as fontes testadas foram utilizadas na forma livre (não-adicionadas ao leite). Pineda, citado por ASHMEAD (1994), comparando os efeitos do FERROCHEL com sulfato ferroso, administrados a adolescentes anêmicos, verificou que o tratamento com 30 mg de FERROCHEL aumentou o nível de hemoglobina na mesma proporção que 120 mg de sulfato ferroso. O tratamento foi realizado

Quadro 11 - Valor biológico relativo (VBR) de algumas fontes de ferro, adicionadas ao leite, determinado por vários autores

Fonte	% de ferro	VBR (%)	Autor
Ferro BioPlex	16,67	99	RANHOTRA et al., 1981
Complexo ferripolifosfato	-	95	DOUGLAS et al., 1981
Pirofosfato férrico de sódio	-	35	“
Ferro carbonílico	16,71	119	CLEMENS, 1981
Ferro eletrolítico	15,51	90	“
Ortofosfato férrico	15,06	31	“

durante quatro semanas e as fontes foram administradas, por via oral, na forma de tabletes.

4.1.3. *Ganho de peso e consumo de dieta*

Os dados referentes ao peso final dos animais, ao ganho de peso e ao consumo total de dieta, obtidos durante a fase de regeneração, encontram-se no Quadro 12. A Análise de Variância dos dados mostra que houve diferença significativa ($p < 0,01$), entre os níveis de ferro, quanto ao ganho de peso e ao consumo de dieta dos ratos, não ocorrendo diferença significativa ($p > 0,01$), entre as fontes de ferro utilizadas.

Os animais que receberam dietas contendo menores níveis de ferro (dieta basal e dieta-controle), apresentaram ganho de peso inferiores àqueles, que foram submetidos a dietas experimentais, contendo as fontes de ferro (dietas 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Quanto ao consumo de dieta, os valores, obtidos para os grupos submetidos às dietas basal e controle, diferiram significativamente ($p < 0,01$) das dietas contendo níveis mais elevados de ferro.

Quadro 12 - Peso final, ganho de peso e consumo de dieta, obtidos durante a fase de regeneração de ratos anêmicos, submetidos a dietas contendo leite enriquecido com ferro

Dietas	Peso no dia 0 (g)	Peso no dia 7 (g)	Peso no dia 14 (g)	Ganho de peso (g)	Consumo de dieta (g)
Dieta 1	198,87 ±19,92	250,13 ±22,84	282,50 ±27,06	83,6 (± 15,3)	261,5 (± 28,3)
Dieta 2	198,75 ±19,57	248,38 ±19,03	289,75 ±22,66	91,0 (± 16,5)	272,8 (± 46,1)
Dieta 3	197,50 ±20,39	250,12 ±13,95	293,00 ±18,10	95,5 (± 11,9)	287,2 (± 20,1)
Dieta 4	197,88 ±17,83	246,25 ±14,85	282,75 ±19,70	84,9 (± 5,9)	263,9 (± 22,8)
Dieta 5	198,00 ±17,11	242,75 ±16,12	288,75 ±17,47	90,8 (± 9,3)	284,8 (± 19,3)
Dieta 6	198,00 ±17,53	250,12 ±23,39	285,25 ±30,17	87,3 (± 17,2)	285,4 (± 35,1)
Controle	197,63 ±16,20	240,88 ±16,91	274,75 ±21,45	77,1 (± 11,7)	249,6 (± 35,1)
Basal	197,63 ±16,20	234,75 ±20,78	268,12 ±23,97	70,50 (±11,04)	251,01 (±35,65)

De acordo com COOK e SKIKNE (1989), o comprometimento do transporte de oxigênio para os tecidos, em virtude da diminuição da concentração de hemoglobina circulante, é um dos principais sintomas da deficiência de ferro. Contudo, a depleção tecidual de enzimas, contendo ferro, está relacionada com outros importantes sintomas da deficiência de ferro, tais como fadiga, anorexia e distúrbios da fome. Muito, provavelmente, os grupos com maior deficiência de ferro (aqueles submetidos às dietas basal e controle) desenvolveram estes sintomas, o que contribuiu para um menor consumo de dieta e, conseqüentemente, menor ganho de peso.

Ao ser relacionado o consumo de dieta com os níveis de ferro encontrados em cada uma delas, foi obtida a quantidade de ferro ingerido, durante a fase de depleção, para cada uma das fontes de ferro. A Figura 5 ilustra o ganho de peso dos ratos, em função da quantidade de ferro ingerido.

A Figura 5 mostra, ainda, que as duas fontes de ferro foram, igualmente, eficientes em proporcionar ganho de peso aos ratos, em função do total de ferro ingerido, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$), entre elas.

4.2. *Análises físico-químicas*

4.2.1. *Acidez titulável*

A acidez titulável do leite resulta da contribuição natural de seus componentes, destacando-se as caseínas e os sais fosfatos e citratos. A acidez original do leite de conjunto varia de 12 a 19°D, considerando 18°D como limite máximo, conforme estabelecido pela legislação federal (BRASIL, 1952). Trabalho, realizado na bacia leiteira de Viçosa, demonstrou que a acidez titulável do leite variou de 13 a 18°D (FROEDER, 1985).

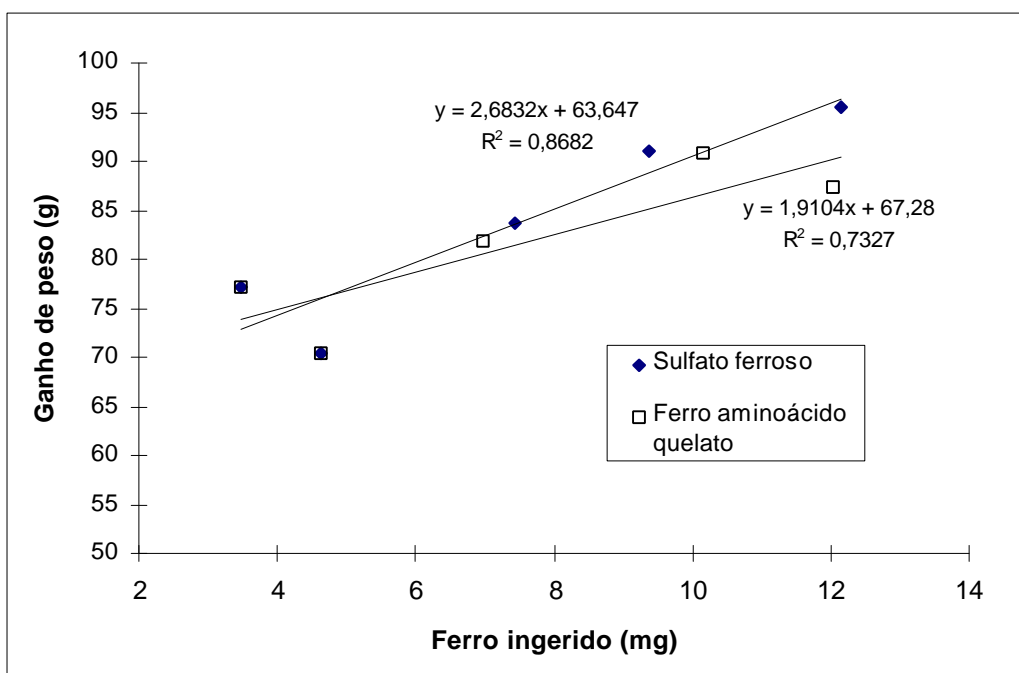


Figura 5 - Ganho de peso de ratos, em função da quantidade de ferro ingerido, provenientes de diferentes dietas, contendo leite em pó, enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato.

A acidez do leite é usada, como referência em diversos processos de elaboração de derivados lácteos e, na plataforma de recepção, como padrão para julgamento da matéria-prima, sendo, portanto, de grande importância para a indústria de laticínios.

A Figura 6 ilustra a variação da acidez do leite, enriquecido com ferro, em função das dosagens, utilizadas para cada uma das fontes de ferro. Os resultados mostram que a adição de sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato não promoveu variação significativa ($p > 0,01$) na acidez Dornic, mesmo quando foram utilizados 24 mg/litro.

O efeito da presença do sulfato ferroso e do ferro aminoácido quelato na acidez titulável do leite, em função do tempo de estocagem, Figura 7, mostra comportamento de ambas as fontes semelhante ao controle, não ocorrendo diferença significativa ($p > 0,01$), entre elas,

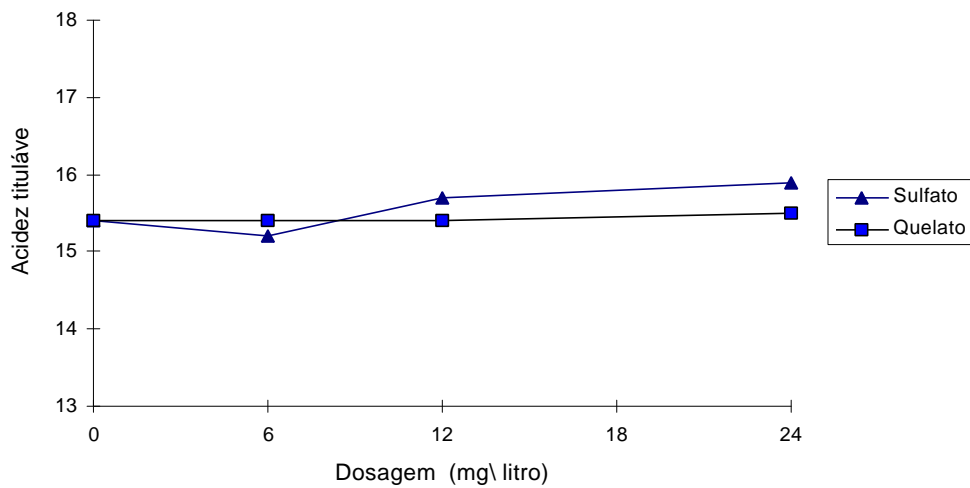


Figura 6 - Variação da acidez titulável do leite enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato, em diferentes dosagens.

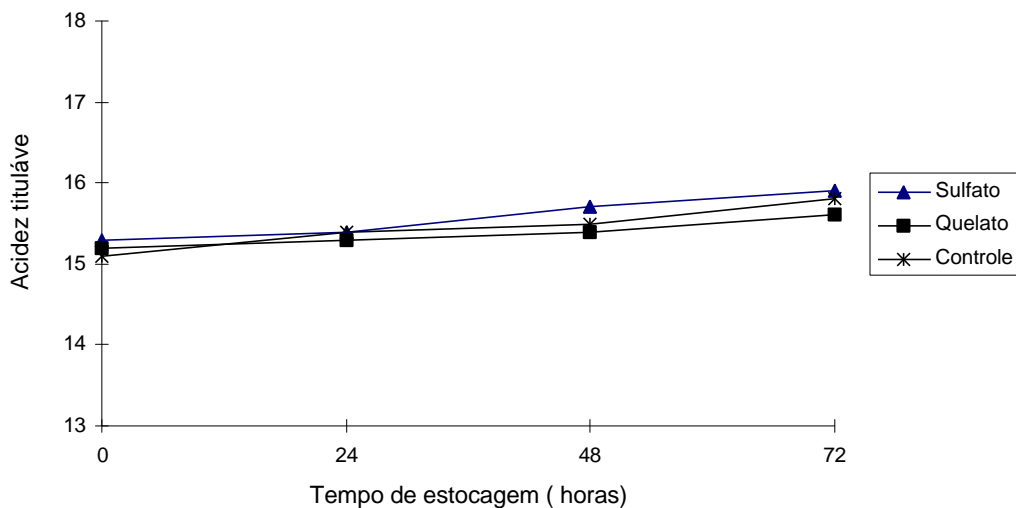


Figura 7 - Variação da acidez titulável do leite enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato, em função do tempo de estocagem a 5°C.

independente da dosagem utilizada, pois a interação “dosagens x tempo” não foi significativa ($p>0,01$) pela Análise de Variância.

Apesar da ligeira elevação da acidez Dornic, ao longo do tempo de estocagem, a acidez de ambas as fontes, após 72 horas, encontrava-se em níveis inferiores a 18°D , considerada normal para leite estocado sob refrigeração, não implicando em diminuição da sua qualidade neste aspecto.

4.2.2. pH

O pH do leite normalmente varia de 6,5 a 6,7 e, em média, corresponde a 6,6. A Figura 8 mostra a variação de pH, em função das dosagens e das fontes de ferro, utilizadas no enriquecimento do leite fluído. Estes resultados indicam que não ocorreu mudança significativa ($p>0,01$) no pH do leite, quando foram adicionadas quantidades crescentes do sal ferroso, ou do quelato.

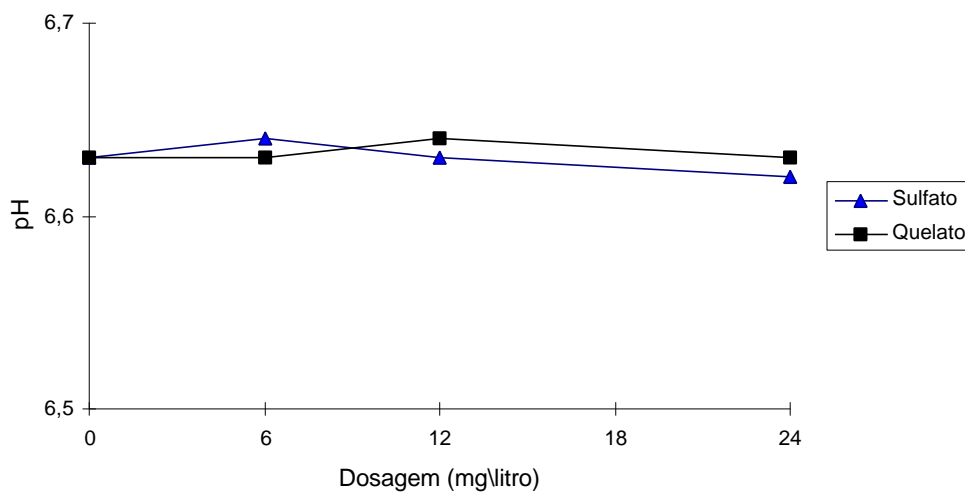


Figura 8 - Variação do pH de leite enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato em diferentes dosagens.

A grande capacidade tamponante do leite, provavelmente, contribuiu para a pequena variação, observada no pH do mesmo. A capacidade tamponante do leite é devida a uma mistura de ácidos fracos com seus sais, tais como citratos, fosfatos, proteínas e carbonatos.

Os valores de pH medidos a intervalos de 24 horas, no leite estocado a 5°C, não indicaram variação significativa ($p>0,01$), quando se adicionou sulfato ferroso ou ferro aminoácido quelato (Figura 9). Este comportamento foi independente da dosagem utilizada, uma vez que a interação “dosagens x tempo” não foi significativa pela Análise de Variância.

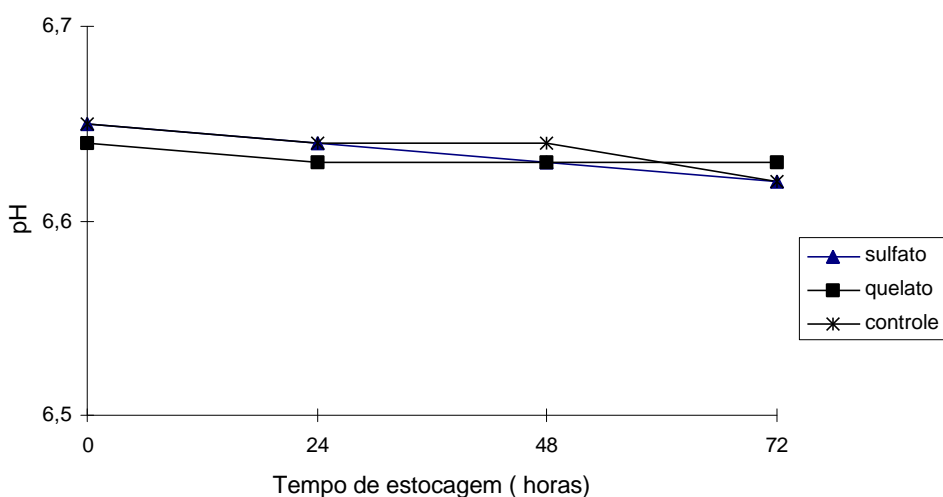


Figura 9 - Variação do pH do leite enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato, em função do tempo de estocagem a 5°C.

Estes resultados são semelhantes àqueles, encontrados por ROSENTHAL e BERNSTEIN (1993). Os referidos autores promoveram o enriquecimento do leite fluído com lactato férrico, na dosagem de 50 mg/litro e obtiveram uma variação de pH de 6,62, 6,60 e 6,59, quando medidos a zero, três e cinco dias de estocagem a 4°C, respectivamente.

4.2.3. Teor de gordura

O teor de gordura do leite para todos os tratamentos foi padronizado para 3,2%. A adição de ferro ao leite nos diferentes níveis utilizados não promoveu alterações significativas, neste valor, ao longo do tempo de estocagem.

4.2.4. Oxidação da gordura (índice de TBA)

A estabilidade oxidativa do leite pasteurizado, expressa pelo índice de TBA, foi influenciada pela adição das fontes de ferro, não ocorrendo, pela Análise de Variância, diferença significativa ($p > 0,01$), entre elas. A Figura 10 mostra a evolução da estabilidade oxidativa para ambas as fontes, em função da dosagem de ferro, adicionada em mg/litro. Os resultados mostram que a presença do ferro promoveu um ligeiro aumento na oxidação da gordura do leite, quando foram adicionados níveis crescentes de ferro, independente da fonte utilizada. Contudo, em nenhum dos casos, estes valores superaram a absorvância de 0,040, acima da qual, segundo KING (1962), o grau de oxidação pode ocasionar sabores distintos ao leite.

A Análise de Variância detectou diferença significativa ($p < 0,01$) entre as absorvâncias, encontradas para as diferentes dosagens, utilizadas no enriquecimento do leite com ferro aminoácido quelato, ou sulfato ferroso.

Os dados, obtidos com o leite não-enriquecido (dose 0), foram semelhantes aos encontrados por outros autores (WANG e KING, 1973; KING, 1962 e BATILDE LIMA et al., 1995). No entanto, WANG e KING (1973) obtiveram valores de TBA mais elevados (0,092 após dois dias de estocagem), quando adicionaram 10 ppm de ferro, como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ao leite pasteurizado. A avaliação sensorial, realizada por esses autores, mostrou diferença significativa ($p < 0,01$) entre o leite, fortificado com sulfato ferroso e

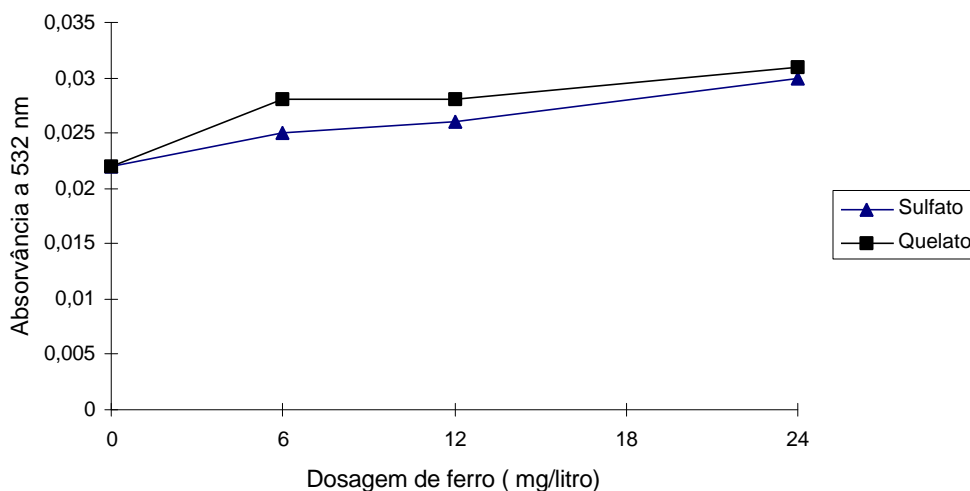


Figura 10 - Valores de absorvância como expressão do índice de TBA em leite enriquecido com diferentes dosagens de sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato.

outras fontes de ferro, e foi considerado inaceitável pelo painel de provadores. Este comportamento não está de acordo com BATILDE LIMA et al. (1995), que obtiveram valores de TBA, variando de 0,039 a 0,042, quando utilizaram a mesma dosagem de sulfato ferroso no mesmo tempo de estocagem. Os resultados da avaliação sensorial evidenciaram que o leite, enriquecido com sulfato ferroso, foi igual ao controle, obtendo-se classificação de “excelente”, durante todo período de estudo.

Os resultados referentes à oxidação do leite, em função do tempo de estocagem para as duas fontes de ferro adicionadas, são mostrados na Figura 11. Observou-se que os valores médios de absorvância do leite controle foram mais baixos que os valores, obtidos para os leites enriquecidos. A Análise de Variância mostrou, ainda, que não houve diferença significativa ($p > 0,01$) entre as fontes de ferro quanto ao tempo de estocagem.

Observa-se variação nos valores de TBA no leite, durante a estocagem, em virtude da decomposição dos aldeídos. O malonaldeído e outros produtos de cadeia curta, provenientes da oxidação lipídica, não

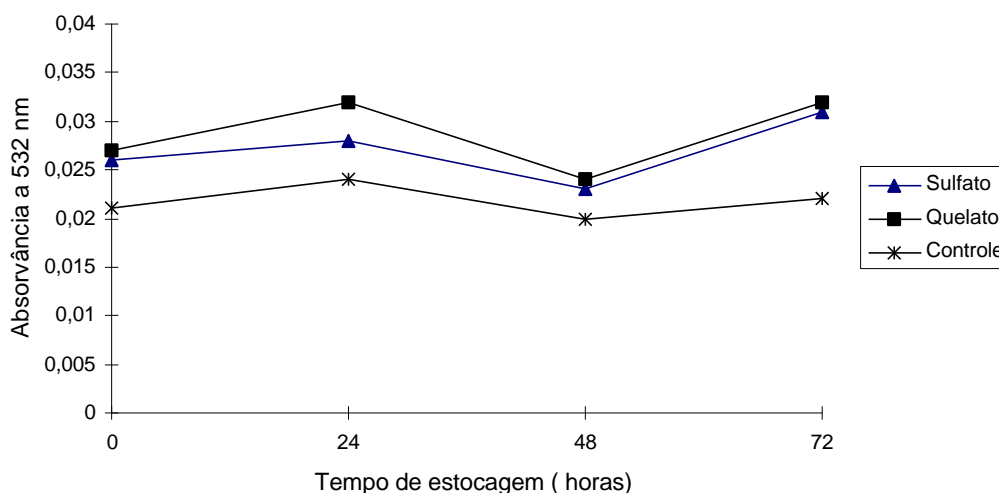


Figura 11 - Valores de absorvância como expressão do índice de TBA em leite enriquecido, em função do tempo de estocagem a 5°C.

são estáveis, durante um longo período de tempo. Além disso, a oxidação destes produtos produz álcoois e ácidos orgânicos, que não são quantificados pelo teste de TBA. Essa oxidação dos aldeídos, no entanto, é responsável pelo declínio no valor de TBA, ao longo do tempo. Isso provavelmente explica a redução nos valores de TBA, após 48 horas de estocagem.

Outras explicações sugerem que as substâncias, que reagem com o TBA, formam complexos com os constituintes dos alimentos, ou se polimerizam (Seo, citado por HOYLAND e TAYLOR, 1991).

Do exposto acima, é possível afirmar que o enriquecimento do leite fluido com sulfato ferroso, ou ferro aminoácido quelato, produziu pequenas alterações do tipo oxidativa na gordura do leite, ao longo de três dias de estocagem a 5°C, quando comparado com o leite sem adição de ferro (controle) e analisado pelo índice de TBA.

Os resultados demonstraram também que o leite homogeneizado, processado comercialmente no sistema LTLT (65°C durante 30 min), apresentou maior instabilidade oxidativa, com valores de TBA superiores,

quando comparados ao leite não-homogeneizado. A Figura 12 mostra a evolução da oxidação do leite, em função dos níveis de ferro, adicionados para as amostras homogeneizada e não-homogeneizada.

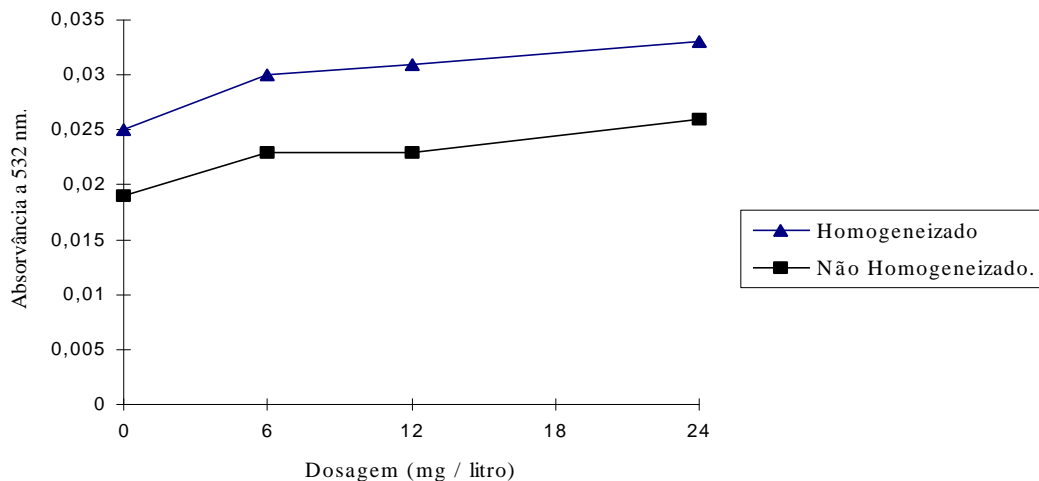


Figura 12 - Valores de absorvância como expressão do índice de TBA em leite homogeneizado e não-homogeneizado enriquecido, com diferentes dosagens de sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato.

Estes resultados são inconsistentes com os apresentados por vários autores, com respeito à estabilidade do sistema lipídico no leite fluído.

A homogeneização é um dos mais eficientes tratamentos, freqüentemente, empregado para controlar sabor oxidado, em leite fluído comercial, mas o mecanismo é desconhecido e as hipóteses, conflitantes (BASSETTE et al., 1986).

Várias explicações têm sido propostas a respeito do efeito da homogeneização e, talvez, a mais plausível seja a de que ocorre uma reorientação, ou reestruturamento da membrana do glóbulo, de gordura influenciando a associação entre o metal catalisador e os lipídios insaturados. Outra hipótese sugere que a homogeneização torna o leite menos susceptível à oxidação, como resultado, possivelmente, da alteração da membrana do glóbulo de gordura, que expõe substâncias inibidoras, presentes na camada mais interna, restringindo a ação catalítica do ferro (Smith e Dunkley, 1962, citados por WANG e KING, 1973).

No entanto, o nível de oxidação para as diferentes concentrações de ferro, para o leite homogeneizado, não diferiu estatisticamente ($p > 0,01$). Estes dados são coerentes com aqueles, obtidos por WANG e KING (1973). Os referidos autores demonstraram que a homogeneização em um sistema comercial com pistão de duplo estágio e pressões de 35,15 e 140,62 kgf/cm² foi eficiente, na prevenção de sabor oxidado em leite enriquecido, com citrato férrico amoniacal nas dosagens de 0, 10, 20 e 30 ppm. Para estas doses, os valores de TBA foram, respectivamente, 0,020, 0,023, 0,025 e 0,026, após sete dias de estocagem.

Para o leite não-homogeneizado, ocorreu uma variação no nível de oxidação, em função das dosagens utilizadas (Figura 12). A rancidez oxidativa, medida pelo índice de TBA, foi mais intensa nas amostras enriquecidas, quando comparadas com o controle (nível zero). A Análise de Variância demonstrou diferença significativa ($p < 0,01$) para os níveis de ferro utilizados.

4.3. *Análise sensorial*

As alterações do sabor do leite constituem um sério problema para a indústria de laticínios, afetando desfavoravelmente o consumo de leite e derivados. Estas alterações tornam-se ainda mais importantes, em razão das inúmeras fontes e dos tipos de defeitos de sabor, aliados à grande suscetibilidade do leite.

Os objetivos dessas análises foram detectar e quantificar o desenvolvimento de sabor oxidado ao leite, quando adicionado de ferro em vários níveis, no início e no final do tempo de estocagem a 5°C. Este sabor oxidado resulta da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados do leite, catalisada por metais, como cobre e ferro (VIOTTO e ROIG, 1993).

As amostras de leite, enriquecidas com ferro, foram avaliadas para sabor oxidado, aplicando-se um método descritivo com uso de escala estruturada, utilizando-se painel de seis julgadores treinados.

O Quadro 13 mostra os resultados obtidos para as amostras, enriquecidas com as duas fontes de ferro em diferentes níveis de adição, em função do tempo de estocagem.

Quadro 13 - Avaliação sensorial para sabor oxidado das amostras de leite enriquecido com ferro (*)

Fontes	Níveis de adição de ferro (mg/litro)	Tempo de estocagem (horas)	
		0	72
Controle	0	2,0	1,7
Sulfato ferroso	6	2,8	2,3
	12	2,6	3,1
	24	3,1	3,9
	6	2	1,5
Ferro aminoácido quelato	12	1,8	2,3
	24	2,1	2,3

(*) Os valores obtidos correspondem às médias dos escores, atribuídos a cada amostra.

Foi verificada diferença significativa ($p < 0,01$), entre as fontes de ferro utilizadas, em relação ao sabor oxidado, avaliado pelo painel de julgadores treinados. A média geral, atribuída ao leite enriquecido com ferro aminoácido quelato (2,0), foi semelhante a do leite sem adição de ferro (1,9), obtendo-se classificação de “moderadamente perceptível”. Ao leite enriquecido com sulfato ferroso foi atribuída média geral igual a 3,0, cuja classificação na escala de categorias corresponde à “perceptível”.

Os resultados da Análise de Variância evidenciaram, ainda, que o efeito dos diferentes níveis de adição de ferro não foi significativo ($p > 0,01$), quando o leite foi enriquecido com ferro aminoácido quelato, tanto no início quanto no final do tempo de estocagem. No entanto, a adição de diferentes dosagens de sulfato ferroso foi significativamente, diferente ($p < 0,05$), quando testada pela Análise de Variância. O escore médio para o nível de adição de 24 mg/l, ao final do tempo de estocagem, foi de 3,9, indicando uma classificação “levemente pronunciado” na escala de categorias.

As Figuras 13 e 14 ilustram o efeito da adição de diferentes níveis de ferro no desenvolvimento de sabor oxidado para o leite homogeneizado

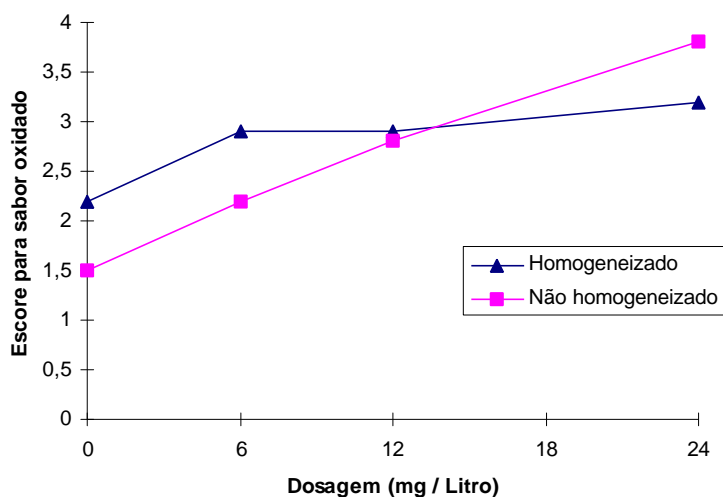


Figura 13 - Efeito da adição de diferentes níveis de ferro no desenvolvimento de sabor oxidado para o leite homogeneizado e não-homogeneizado enriquecido com sulfato ferroso.

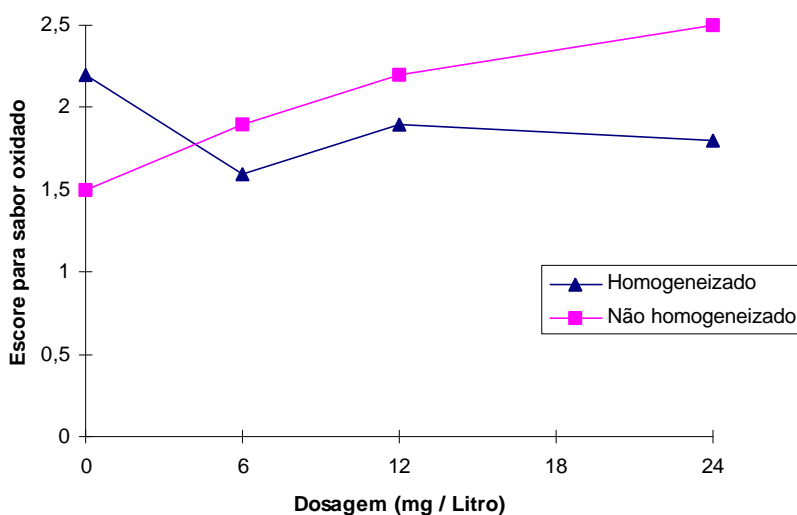


Figura 14 - Efeito da adição de diferentes níveis de ferro no desenvolvimento de sabor oxidado para o leite homogeneizado e não-homogeneizado enriquecido com ferro aminoácido quelato.

e não-homogeneizado, enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato, respectivamente.

Os resultados testados pela Análise de Variância mostram que não houve diferença significativa ($p>0,01$), entre as diferentes dosagens, para o leite homogeneizado, enriquecido com ferro aminoácido quelato. Estes resultados confirmam aqueles, obtidos na análise da estabilidade oxidativa do leite enriquecido, medido pelo índice de TBA.

O leite não-homogeneizado apresentou diferença significativa ($p<0,01$) para os diferentes níveis de adição de ferro, tanto para o sulfato ferroso quanto para o ferro aminoácido quelato. Observou-se um incremento nos escores, atribuídos para sabor oxidado, em função do aumento dos níveis de ferro adicionados (Figuras 13 e 14). Resultados semelhantes foram obtidos nos testes de TBA.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram enriquecidas amostras de leite fluído tipo C com ferro aminoácido quelato e sulfato ferroso, nos níveis de adição (0, 6, 12 e 24 mg/litro), e realizou-se estudo da biodisponibilidade relativa, por meio da recuperação dos níveis de hemoglobina em ratos anêmicos. Foram promovidas, ainda, análises físico-químicas e sensorial das amostras enriquecidas com ferro, submetidas à homogeneização, ou não, estocadas sob refrigeração a 5°C, durante 72 horas.

Os resultados apresentados indicam as seguintes conclusões:

- O valor biológico do ferro aminoácido quelato, adicionado ao leite tipo C, foi equivalente ao do sulfato ferroso, indicando que a ingestão diária deste composto, nos níveis de 12 e 24 mg/l, é capaz de proporcionar concentração suficiente de ferro disponível para, rapidamente, restabelecer os níveis de hemoglobina em ratos anêmicos.
- Os animais, submetidos a dietas com menores níveis de ferro (igual, ou inferior a 18,5 mg/kg), com possível depleção tecidual deste elemento, tendem a um menor consumo alimentar, com conseqüente menor ganho de peso, quando comparados a animais normais.
- É possível enriquecer o leite fluído pasteurizado com 24 mg de ferro/litro, na forma de ferro aminoácido quelato, sem afetar sua

qualidade físico-química, ou sensorial, durante o período de estocagem de 72 horas, quando mantido sob refrigeração a 5°C.

- O uso de sulfato ferroso nas dosagens de 12 e 24 mg de Ferro/litro promove alterações perceptíveis, no sabor do leite pasteurizado homogeneizado, ou não, mantido a 5°C.
- O ferro aminoácido quelato mostrou-se uma fonte de ferro promissora para enriquecimento do leite tipo C, podendo ser empregado em programas institucionais de suplementação alimentar, em substituição ao sulfato ferroso.
- O processamento tecnológico do enriquecimento do leite com ferro mostrou-se simples e viável, dispensando grandes alterações nas atividades normais de uma indústria de laticínios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, J.V.D., RODRIGUES, P.P.B., FONTOURA, J.B., D'AGNOLUZZO, R., HORTA, V.F., ALVES, J.G.B. Tratamento da anemia ferropriva com hidróxido de ferro polimaltosado. **Arq. Bras. Med.**, v.66, n.3, p.253-258,1992. (ABP-Supl.)
- ANGELIS, R.C. de, CTENAS, M.L. de. **Biodisponibilidade de ferro na alimentação infantil**. S.l.: Nestlé, Serviço de Informação Científica, 1993. p. 33. (Temas de pediatria, 52).
- ARAÚJO, C.R de. Enriquecimento de novos produtos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE ALIMENTOS ENRIQUECIDOS, 1, 1994, Campinas. **Resumos...** Campinas: ITAL,UNICAMP, 1994. p. 49 - 50.
- ASHMEAD, H.DeWayne. **Conversations on chelation and mineral nutrition**.New Canaan, Connecticut: Keats Publishing, 1989. 241 p.
- ASHMEAD, H.DeWayne, RAPP, E.J., NAME, J.J. Uso de aminoácidos quelatos na fortificação de alimentos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE ALIMENTOS ENRIQUECIDOS, 1, 1994, Campinas. **Resumos...** Campinas: ITAL,UNICAMP, 1994. p. 32-37.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 14.ed. Arlington:Sidiney Willians, 1984. 1141 p.
- BALDWIN, R.E, SHELLEY, D.S., MARSHALL, R.T. Flavor of milk one week after adition of iron complex. **J. Dairy Sci.**, v.65, p.1390 - 1393, 1982.

- BASSETE, R., FUNG, D.Y.C., MANTHA, V.R. Off flavors in milk. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.24, n.1 p.1. 1986.
- BATILDE LIMA, L., BANGUELA PEREZ, S., ORTEGA BOLÃÑOS, M.J. de., TORRICELLA, R., CAMEJO CORRALES, J. Leche fluida y yogur natural enriquecidos con hierro. **Alimentaria**, Habana, p.63-66, Mar.1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura -RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto 30.691, de 29/3/52. Brasília, 1952.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. **Considerações sobre anemia nutricional**. Brasília: 1986. “não paginado”.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. **Programa Nacional de Controle das Anemias Nutricionais**. [s.l.:s.n]. 1991. (Mimeograf.).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução 12/78 do CNNPA. Legislação de Alimentos. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, 24 Jul. 1978.
- CARDOSO, H.T., PENNA, L.C., CABRAL, M.D. Desenvolvimento de quelatos de ferro como antianêmicos. **O Hospital**, v.77, n.6, p.1807-1819. Jun. 1970.
- CARVALHO, P.R.N. Enriquecimento de alimentos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE ALIMENTOS ENRIQUECIDOS, I, 1994, Campinas. **Resumos...** Campinas: ITAL, UNICAMP, 1994. p.1-7.
- CHAUD, M.V. **Quelato peptídeo ferro: uma alternativa para aumentar a biodisponibilidade do ferro**. São Paulo: USP, 1993. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, 1993.
- CHAVES, J. B. P. A análise sensorial na indústria de laticínios. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.45, n.267/272, p.38-52, 1990.
- CHAVES, J. B. P. **Métodos de diferença em avaliação sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1993. 91 p.

- CLEMENS, R.A. Effects of storage on the bioavailability and chemistry of iron powders in a heat-processed liquid milk-based product. **Journal of Food Science.** v.47, p. 228-230, 1981.
- COOK, J.D. Adaptation in iron metabolism. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.51, n.2, p.301-308, 1990.
- COOK, J. D., BAYNES, R.D., BARRY, S.S. Iron deficiency: definition and the measurement of iron status. **Nutrition Research Reviews**, v.5, p.189-202, 1992.
- COOK, J.D., REUSSER, E.M. Iron fortification: an update. **Am. J. Clin. Nutr.** v.38, n.4, p.648-659, 1983.
- COOK, J.D., SKIKNE, B.S. Iron deficiency: definition and diagnosis. **J. Inter. Med.**, v.226, n.5, p.349-355, 1989.
- COPLAP- Coop. dos produtores de leite da Alta Paulista Ltda. Coplap sai na frente mais uma vez e produz leite fortificado. **Jornal do Campo**, v.11, n.132, p.3, Out. 1994.
- DALLMAN, P.R., SIIMES, M.A., STEKEL, A. Iron deficiency in infancy and childhood. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.33, p.86-118, 1980.
- DEMOTT, B.J. Effects on flavor of fortifying milk with iron and absorption of the iron from intestinal tract of rats. **J. Dairy Sci.**, v.54, n.11 p.1609-1614, 1971.
- DOUGLAS, F.W. JR., RAINEY, N.H., WONG, N.P., EDMONDSON, L. F., LACROIX, D. E.. Color, flavor, and iron bioavailability in iron-fortified chocolate milk. **J. Dairy Sci.** v.64, n.9, p.1785 - 1793, 1981.
- EDMONDSON, L.F., DOUGLAS JUNIOR, F.W., AVANTS J.K. Enrichment of pasteurized whole milk with iron. **J. Dairy Sci.**, v.54, n.10 p.1422-1426, 1971.
- FROEDER, E. **Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru na bacia leiteira de Viçosa.** Viçosa: UFV, 1985. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1985.
- GUTHRIE, H.. **Introductory nutrition.** St. Louis: C. V. Mosby College Publishing, 1975. 147p.
- HOYLAND, D.V., TAYLOR, A.J. A review of the methodology of the 2-tiobarbituric acid test. **Food Chem.**, v.40, p. 271-291, 1991.

- KING, R.L. Oxidation of milk fat globule membrane material. I. Thiobarbituric acid reaction as a measure of oxidized flavor in milk and model systems. **J. Dairy Sci.**, v.45, p.1165, 1962.
- KRAUSE, M.V., MAHAN, L.K. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 1993.981 p.
- LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL-LANARA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II - Métodos físico-químicos**. Brasília: 1981. 121 p.
- MAGALHÃES, P., SILVA, G.B. **Levantamento da prevalência da anemia ferropriva em pré-escolares de creches municipais de Viçosa-MG**. Viçosa: s.n.. 1993. 30 p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Recommended Dietary Allowances**.10.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1989. 284 p.
- OLIVARES, M., WALTER, T., HERTRAMPF, E. PIZARRO, F., STEKEL, A. Prevention of iron deficiency by milk fortification- the chilean experience. **Acta Paediatr. Scand. Suppl.** n.361, p. 109-113, 1989.
- RANHOTRA, G.S., GELROTH, J.A., TORRENCE, F.A., BOCK, M.A., WINTERRINGER, G.L. Bioavailability of iron in iron-fortified fluid milk. **J. Food Sci.**, v.46, p.1342-1344, 1981.
- RIVERA, R., RUIZ, R., HEGENAUER, J., SALTMAN, P., GREEN R. Bioavailability of iron and copper supplemented milk for Mexican school children. **Amer. J. Clin. Nutr.**, v.36, p.1162-1169, 1982.
- ROSENTHAL, B. R., BERNSTEIN, S. Effects of milk fortification with ascorbic acid and iron. **Milchwissenschaft**, v.48, n.12 p.676-679, 1993.
- RUSIG, O. Enriquecimento de leite e derivados. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE ALIMENTOS ENRIQUECIDOS, 1, 1994, Campinas. **Resumos...** Campinas: ITAL,UNICAMP, 1994. p.38-46.
- SÃO PAULO. Secretaria de Saúde. Grupo de Atenção à Nutrição-GAN. Centro de Apoio ao Desenvolvimento de Assistência Integral à Saúde - CADAIS - **Ofício 58/94 de 04/07/94**, São Paulo, 1994.

- SELIGMAN, P.A., CASKEY, J.H., FRAZIER, J.L., ZUCKER, R.M., PODELL, E.R., ALLEN, R.H. Measurement of iron absorption from prenatal multivitamin-mineral supplements. *Obstetrics and Gynecology*, V.61, n.3, P.356-362, 1983.
- SIGULEM, D.M., TUDISCO, E.S.P., GOLDENBERG, M.M, ATHAIDE, M., VAISMAN, E. Anemia ferropriva em crianças do município de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.12, p.166-178, 1978.
- SPOLIDORO, F.L. Enriquecimento de alimentos institucionais. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE ALIMENTOS ENRIQUECIDOS, 1, 1994, Campinas. **Resumos...** Campinas: ITAL,UNICAMP, 1994. p. 51-59.
- STEKEL, A., PIZARRO, F., OLIVARES, M., CHADUD, P., LLAGUNO, S., CAYAZZO, M., HERTRAMPF, E., WALTER, T. Prevention of iron deficiency by milk fortification. III. Effectiveness under the usual operation conditions of a nation-wide food program. **Nutr. Reports Intern.**, v.38, n.6, p.1119-1128, 1988.
- VIOTTO, W.H., ROIG, S.M. Desvios do sabor do leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, v.48, n.288, p.25-33, Out./Dez., 1993.
- WANG, C.F., KING, R.L. Chemical and sensory evaluation of iron fortified milk. **J. Food Sci.**, v.38, n.6, p.938-940, 1973.

APENDICE

APÊNDICE

Quadro 1A - Análise de Variância da regressão para o ganho de hemoglobina

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Fontes de ferro	1	0,091125	0,091125	0,048	ns
Níveis de ferro	4	677,8507	169,4627	88,876	*
Regressão linear	1	658,9381	658,9381	345,585	*
Desvio da regressão	3	18,9126	6,3042	3,30628	ns
Fontes x Níveis de ferro	1	0,21074	0,060187	0,032	ns
Resíduo	70	133,4713	1,90673		
Total	80	812,4440			

ns - Não-significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 2A - Análise de Variância da regressão para o ganho de peso

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Fontes de ferro	1	42,05000	42,05000	0,265	ns
Níveis de ferro	4	5.189,297	1.297,324	8,186	*
Regressão linear	1	3.822,025	3.822,025	21,117	*
Desvio da regressão	3	1.367,272	455,7574	2,875	ns
Fontes x níveis de ferro	1	236,7000	59,1750	0,373	ns
Resíduo	70	11.093,50	158,4786		
Total	80	16.561,547			

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 3A - Análise de Variância da regressão para o consumo de dieta

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Significância
Fontes de ferro	1	128,2709	128,2709	0,145	ns
Níveis de ferro	4	17.248,39	4.312,099	4,869	*
Regressão linear	1	16.353,94	16.353,94	18,467	*
Desvio da regressão	3	894,4559	298,1519	0,34848	ns
Fontes x níveis de ferro	1	491,1317	122,7829	0,139	ns
Resíduo	70	61.989,77	885,5681		
Total	80	79.857,56			

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 4A - Análise de Variância dos valores de acidez Dornic

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Fontes de ferro	1	0,632812	0,632812	2,125	ns
Dosagens de ferro	3	2,898438	0,9661458	3,245	ns
Tratamento do leite	1	1,320313	1,320313	4,434	ns
Tempo de estocagem	3	6,648438	2,216146	7,443	*
Fonte x dosagens	3	2,210938	0,7369792	2,475	ns
Fonte x tratamento	1	0,195312	0,1953125	0,656	ns
Fonte x tempo	3	0,085937	0,02864583	0,096	ns
Tratamento x dosagens	3	0,273437	0,09114584	0,306	ns
Tratamento x tempo	3	0,273437	0,09114584	0,306	ns
Dosagens x tempo	9	0,382812	0,0425347201	0,143	ns
Resíduo	97	28,88281	0,2977610		
Total	127				

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 5A - Análise de Variância dos valores de pH

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Fontes de ferro	1	0,00028203	0,00028203	0,459	ns
Dosagens de ferro	3	0,00480856	0,00160285	2.611	ns
Tratamento do leite	1	0,00158205	0,00158205	2.577	ns
Tempo de estocagem	3	0,00562108	0,00187369	3.052	ns
Fonte x dosagens	3	0,00412106	0,00137368	2.237	ns
Fonte x tratamento	1	0,00013202	0,00013202	0,215	ns
Fonte x tempo	3	0,00387109	0,00129036	2.102	ns
Tratamento x dosagens	3	0,00224609	0,00074869	1.219	ns
Tratamento x tempo	3	0,00312107	0,00104035	1.694	ns
Dosagens x tempo	9	0,00341328	0,00037925	0,618	ns
Resíduo	97	0,05955699	0,00061398		
Total	127				

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 6A - Análise de Variância dos valores de absorvância como expressão do índice de TBA

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Fontes de ferro	1	0,00008533	0,00008533	0,767	ns
Dosagens de ferro	3	0,00157700	0,00052566	4,725	*
Tratamento do leite	1	0,00205408	0,00205408	18,461	*
Tempo de estocagem	3	0,00138862	0,00046287	4,160	*
Fonte x dosagens	3	0,00006849	0,00002283	0,205	ns
Fonte x tratamento	1	0,00000675	0,00000675	0,061	ns
Fonte x tempo	3	0,00008420	0,00002806	0,252	ns
Tratamento x dosagens	3	0,00003375	0,00001125	0,101	ns
Tratamento x tempo	3	0,00157737	0,00052579	4,726	*
Dosagens x tempo	9	0,00032954	0,00003661	0,329	ns
Resíduo	161	0,01791350	0,00011126		
Total	191	0,02511863	0,00387049		

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 7A - Análise de Variância dos valores de absorvância como expressão do índice de TBA, para o **tratamento homogeneizado**

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Fontes de ferro	1	0,000017510	0,000017510	0,082	ns
Dosagens de ferro	3	0,000998864	0,000332954	1,566	ns
Tempo de estocagem	3	0,002564864	0,000854954	4,022	*
Fonte x dosagens	3	0,000026031	0,000008677	0,041	ns
Fonte x tempo	3	0,000075531	0,000025177	0,118	ns
Dosagens x tempo	9	0,000488760	0,000054306	0,255	ns
Resíduo	73	0,015518090	0,000212576		
Total	95	0,01968965	0,001506154		

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 8A - Análise de Variância dos valores de absorvância como expressão do índice de TBA, para o **tratamento não-homogeneizado**

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Fontes de ferro	1	0,000070041	0,000070041	2,487	ns
Dosagens de ferro	3	0,000621208	0,000207069	7,354	*
Tempo de estocagem	3	0,000350791	0,000116930	4,152	*
Fonte x dosagens	3	0,000038875	0,000012958	0,460	ns
Fonte x tempo	3	0,000027125	0,000009041	0,321	ns
Dosagens x tempo	9	0,000105958	0,00001177	0,418	ns
Resíduo	73	0,002055625	0,00002815		
Total	95	0,003269623	0,000455959		

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 9A - Análise de Variância dos resultados da análise sensorial para sabor oxidado

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Fontes de ferro	1	27,00000	27,00000	11,679	*
Dosagens de ferro	3	19,45833	6,486111	2,806	ns
Tratamento do leite	1	0,750002	0,750000	0,324	ns
Tempo de estocagem	1	0,083333	0,083333	0,036	ns
Julgador	5	114,3542	22,87084	9,893	*
Fonte x dosagens	3	9,458328	3,152776	1,364	ns
Fonte x tratamento	1	1,333333	1,333333	0,577	ns
Fonte x tempo	1	0,333333	0,333333	0,144	ns
Tratamento x dosagens	3	19,37499	6,458332	2,794	ns
Tratamento x tempo	1	2,083332	2,083332	0,901	ns
Dosagens x tempo	3	15,29167	5,097222	2,205	ns
Resíduo	168	388,3958	2,311880		
Total	191	597,916651	77,960492		

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 10A - Análise de Variância dos resultados da análise sensorial (sabor oxidado) **para ferro aminoácido quelato**

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Dosagens de ferro	3	2,2083	0,73611	0,316	ns
Tratamento do leite	1	0,04166	0,04166	0,018	ns
Tempo de estocagem	1	0,37500	0,37500	0,161	ns
Julgador	5	62,0833	12,4166	5,337	*
Tratamento x Dosagens	3	10,7083	3,56944	1,534	ns
Tratamento x Tempo	1	0,37500	0,37500	0,161	ns
Dosagens x Tempo	3	6,70833	2,23611	0,961	ns
Resíduo	78	181,458	2,32638		
Total	95	263,95789	22,0763		

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 11A - Análise de Variância dos resultados da análise sensorial (sabor oxidado) **para sulfato ferroso**

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Dosagens de ferro	3	26,70833	8,90277	3,435	**
Tratamento do leite	1	2,041667	2,041667	0,788	ns
Tempo de estocagem	1	0,041666	0,041666	0,016	ns
Julgador	5	53,20890	10,6416	4,106	*
Tratamento x dosagens	3	11,0415	3,68055	1,420	ns
Tratamento x tempo	1	2,04166	2,04166	0,788	ns
Dosagens x tempo	3	9,70830	3,23611	1,249	ns
Resíduo	78	202,1667	2,59188		
Total	95	306,958723	33,177903		

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

** - Significativo em nível de 5% de probabilidade.

Quadro 12A - Análise de Variância dos resultados da análise sensorial (sabor oxidado) **para o tratamento homogeneizado**

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Fontes de ferro	1	20,16667	20,16667	7,088	*
Dosagens de ferro	3	1,25000	0,41666	0,166	ns
Tempo de estocagem	1	0,66666	0,66666	0,234	ns
Julgador	5	52,3333	10,4666	3,679	*
Fontes x dosagens	3	6,25000	2,08333	0,732	ns
Fontes x tempo	1	0,66666	0,66666	0,234	ns
Dosagens x tempo	3	6,08333	2,02777	0,713	ns
Resíduo	78	221,9167	2,8450		
Total	95				

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 13A - Análise de Variância dos resultados da análise sensorial (sabor oxidado) para o **tratamento não-homogeneizado**

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Fontes de ferro	1	8,166667	8,166667	4,823	ns
Dosagens de ferro	3	37,58133	12,52778	7,398	*
Tempo de estocagem	1	1,500000	1,500000	0,886	ns
Julgador	5	91,83333	18,36666	10,846	*
Fonte x dosagens	3	5,58333	1,861111	1,099	ns
Fonte x tempo	1	1,8x10 ³⁰	1,8x10 ³⁰	0,0000	ns
Dosagens x tempo	3	11,07333	3,69444	2,183	ns
Resíduo	78	132,0833	1,69337		
Total	95				

ns - Não-Significativo em nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Quadro 14A - Valores para ganho de hemoglobina, consumo de dieta e ganho de peso durante a fase de regeneração

Dieta	Rato	Ganho de hemoglobina (g/100 ml)	Consumo de dieta (g)	Ganho de peso (g)
Controle	1	6,5	268,8	75,0
Controle	2	2,6	282,0	94,0
Controle	3	3,9	238,0	76,0
Controle	4	4,1	270,8	81,0
Controle	5	4,2	232,6	65,0
Controle	6	4,3	230,1	58,0
Controle	7	4,0	240,8	89,0
Controle	8	2,2	233,7	79,0
Basal	1	4,7	283,6	74,0
Basal	2	5,2	288,0	85,0
Basal	3	4,0	259,5	68
Basal	4	4,7	279,6	83,0
Basal	5	2,8	212,9	53,0
Basal	6	5,3	265,0	73,0
Basal	7	7,5	193,5	58,0
Basal	8	6,2	226,0	70,0
Dieta 1	1	4,4	306,9	95,0
Dieta 1	2	6,7	282,4	79,0
Dieta 1	3	7,3	274,2	86
Dieta 1	4	10,3	237,6	66,0
Dieta 1	5	5,5	254,5	78,0
Dieta 1	6	5,7	274,6	115,0
Dieta 1	7	6,9	242,6	76,0
Dieta 1	8	6,2	219,3	74,0
Dieta 2	1	10,1	326,5	106,0
Dieta 2	2	9,0	265,7	87,0
Dieta 2	3	8,9	297,0	82,0
Dieta 2	4	10,6	210,4	67,0
Dieta 2	5	9,2	204,2	89,0
Dieta 2	6	10,2	260,5	85

Continua...

Quadro 14A, Cont.

Dieta	Rato	Ganho de hemoglobina (g/100 ml)	Consumo de dieta (g)	Ganho de peso (g)
Dieta 2	7	7,8	307,1	90,0
Dieta 2	8	9,2	310,7	
Dieta 3	1	10,0	305,2	88,0
Dieta 3	2	12,0	282,3	105,0
Dieta 3	3	12,4	296,2	85,0
Dieta 3	4	14,4	323,8	106,0
Dieta 3	5	10,9	266,6	86,0
Dieta 3	6	12,4	275,0	85,0
Dieta 3	7	12,6	283,1	93,0
Dieta 3	8	10,6	265,1	116,0
Dieta 4	1	7,4	287,6	89,0
Dieta 4	2	8,5	258,4	85,0
Dieta 4	3	5,9	269,6	88,0
Dieta 4	4	6,8	282,4	73,0
Dieta 4	5	6,9	246,9	86,0
Dieta 4	6	6,6	281,2	86,0
Dieta 4	7	6,1	266,8	92,0
Dieta 4	8	6,9	218,4	80,0
Dieta 5	1	10,4	317,5	100,0
Dieta 5	2	4,9	300,0	81,0
Dieta 5	3	11,8	275,7	86,0
Dieta 5	4	10,3	289,9	90,0
Dieta 5	5	8,7	286,3	86,0
Dieta 5	6	8,8	259,3	90,0
Dieta 5	7	11,0	261,8	84,0
Dieta 5	8	8,8	288,2	109,0
Dieta 6	1	13,1	302,8	98,0
Dieta 6	2	13,2	313,4	97,0
Dieta 6	3	10,8	301,0	97,0
Dieta 6	4	11,8	324,1	111,0
Dieta 6	5	11,9	225,5	59,0
Dieta 6	6	12,8	282,9	73
Dieta 6	7	10,9	239,2	73
Dieta 6	8	11,7	293,9	90

Quadro 15A - Níveis de hemoglobina (g/100 ml) de ratos submetidos às dietas experimentais, medidos no início da fase de regeneração (tempo 0)

Rato	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Controle	Basal
1	5,1	4,4	5,7	4,9	4,5	4,7	5,5	4,6
2	4,5	5,1	5,1	4,9	6,5	4,4	5,9	4,9
3	4,7	4,5	5,2	4,5	5,3	4,5	5,9	3,0
4	6,3	6,5	3,9	4,8	6,0	3,9	4,1	3,8
5	3,8	5,3	5,7	6,1	3,9	6,1	4,5	5,7
6	5,7	3,9	4,7	5,0	4,9	4,3	4,3	4,9
7	6,8	5,9	4,5	5,9	4,7	6,7	5,3	5,1
8	3,6	5,1	6,5	4,7	5,3	4,4	5,3	6,1

Quadro 16A - Níveis de hemoglobina (g/100 ml) de ratos submetidos às dietas experimentais, após 7 dias da fase de regeneração

Rato	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Controle	Basal
1	8,0	7,2	9,0	6,4	8,0	9,8	6,5	5,3
2	6,8	7,0	9,0	6,5	5,7	9,8	6,1	5,7
3	6,5	6,4	9,5	5,9	8,0	8,9	5,9	4,1
4	8,5	9,0	8,7	6,4	7,1	7,8	4,8	5,1
5	4,7	8,5	9,5	8,7	7,5	8,0	4,7	5,1
6	6,8	7,5	8,5	6,5	6,5	9,5	5,3	5,7
7	8,0	7,2	8,5	8,0	7,2	10,1	7,0	7,8
8	5,3	8,0	9,8	5,9	6,8	9,0	4,9	7,7

Quadro 17A - Níveis de hemoglobina (g/100 ml) de ratos submetidos às dietas experimentais, após 14 dias da fase de regeneração

Rato	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Controle	Basal
1	9,5	14,5	15,7	12,3	14,9	17,8	12,0	9,3
2	11,2	14,1	17,1	13,4	11,4	17,6	8,5	10,1
3	12,0	13,4	17,6	10,4	17,1	15,3	9,8	7,0
4	16,6	17,1	18,3	11,6	15,3	15,7	8,2	8,5
5	9,3	14,5	16,6	13,0	12,6	18,0	8,7	8,5
6	11,4	14,1	17,1	11,6	13,7	17,1	8,6	10,2
7	13,7	13,7	17,1	12,0	15,7	17,6	9,3	12,6
8	9,8	15,3	17,1	11,6	14,1	16,1	7,5	12,3

Quadro 18A - Ingestão de ferro dietético (mg) em ratos submetidos às dietas experimentais, após 7 dias da fase de regeneração

Rato	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Controle	Basal
1	4,32	5,16	6,10	3,47	5,49	6,54	1,92	2,59
2	4,01	4,33	5,56	3,35	4,93	6,70	1,80	2,65
3	3,81	5,29	6,33	3,20	4,72	6,11	1,64	2,31
4	3,48	3,45	6,58	3,97	4,75	6,72	1,83	2,48
5	3,51	4,44	5,38	3,14	5,16	4,94	1,59	1,83
6	3,67	4,39	5,98	3,61	4,47	5,77	1,58	2,36
7	3,45	5,06	5,94	3,49	4,67	5,15	1,59	1,92
8	2,49	4,84	5,16	3,31	4,63	5,92	1,64	2,06

Quadro 19A - Ingestão de ferro dietético (mg) em ratos submetidos às dietas experimentais, após 14 dias da fase de regeneração

Rato	Dieta1	Dieta2	Dieta3	Dieta4	Dieta5	Dieta6	Dieta7	Dieta8
1	4,43	6,04	6,81	4,12	5,82	6,24	1,82	2,65
2	4,04	4,79	6,38	3,47	5,76	6,53	2,12	2,68
3	4,01	4,90	6,20	3,92	5,10	6,59	1,67	2,49
4	3,29	3,76	7,11	3,48	5,58	6,96	1,94	2,70
5	3,74	2,56	5,90	3,38	5,05	4,57	1,65	2,11
6	4,15	4,54	5,65	3,82	4,77	6,17	1,62	2,54
7	3,46	5,47	6,04	3,55	4,66	4,94	1,76	1,66
8	3,76	5,82	6,06	2,46	5,64	6,48	1,61	2,12

Quadro 20A - Ingestão total de ferro dietético (mg) em ratos submetidos às dietas experimentais, durante a fase de regeneração

Rato	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Controle	Basal
1	8,75	11,20	12,91	7,59	11,32	12,78	3,74	5,25
2	8,05	9,11	11,94	6,82	10,69	13,23	3,92	5,33
3	7,81	10,19	12,53	7,12	9,83	12,70	3,31	4,80
4	6,77	7,22	13,70	7,46	10,33	13,68	3,76	5,17
5	7,25	7,00	11,28	6,52	10,21	9,52	3,23	3,94
6	7,83	8,94	11,63	7,42	9,24	11,94	3,20	4,90
7	6,91	10,53	11,98	7,04	9,33	10,09	3,35	3,58
8	6,25	10,66	11,21	5,77	10,27	12,40	3,25	4,18

Quadro 21A - Peso (g) dos ratos no início da fase de regeneração (tempo 0)

Rato	Dieta1	Dieta2	Dieta3	Dieta4	Dieta5	Dieta6	Controle	Basal
1	235	234	231	227	226	226	221	221
2	209	209	209	211	211	214	214	216
3	208	208	208	207	206	206	206	205
4	200	200	201	201	202	202	203	205
5	199	198	197	196	196	192	192	191
6	186	187	188	189	189	190	190	191
7	186	186	184	182	182	182	181	180
8	168	168	162	170	172	172	174	175

Quadro 22A - Peso (g) dos ratos após 7 dias da fase de regeneração

Rato	Dieta1	Dieta2	Dieta3	Dieta4	Dieta5	Dieta6	Controle	Basal
1	289	284	265	274	276	285	265	260
2	254	258	268	259	255	272	260	263
3	255	261	258	255	247	258	250	241
4	241	237	259	241	244	262	248	247
5	237	252	240	239	246	232	225	217
6	254	233	242	233	237	248	222	225
7	262	235	238	236	228	225	230	213
8	209	227	231	233	225	219	227	212

Quadro 23A - Peso (g) dos ratos após 14 dias da fase de regeneração

Rato	Dieta1	Dieta2	Dieta3	Dieta4	Dieta5	Dieta6	Dieta7	Dieta8
1	330	340	319	316	326	324	296	295
2	288	296	314	296	292	311	308	299
3	294	290	293	295	292	303	282	274
4	266	267	307	274	292	313	284	286
5	277	287	283	282	282	251	257	245
6	301	272	273	275	279	263	248	263
7	262	276	277	274	266	255	270	239
8	242	290	278	250	281	262	253	244

Quadro 24A - Consumo semanal de dieta dos ratos (1^a semana da fase de regeneração)

Rato	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Controle	Basal
1	151,5	150,5	144,3	131,5	153	155	137,9	140,2
2	140,6	126,1	131,4	126,9	137,4	158,7	129,5	143,4
3	133,6	154,2	149,7	121,3	131,6	144,9	118	125
4	122	100,7	155,6	150,4	132,4	159,2	131,5	133,9
5	123,1	129,5	127,1	118,8	143,7	117,1	114,1	99,1
6	128,9	128	141,4	136,6	124,6	136,8	113,9	127,5
7	121,1	147,5	140,4	132,2	130,1	122,1	114,5	104
8	87,4	141	121,9	125,4	128,9	140,3	118,1	111,2

Quadro 25A - Consumo semanal de dieta dos ratos (2^a semana da fase de regeneração)

Rato	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Controle	Basal
1	155,4	176	160,9	156,1	164,5	147,8	130,9	143,4
2	141,8	139,6	150,9	131,5	162,6	154,7	152,5	144,6
3	140,6	142,8	146,5	148,3	144,1	156,1	120	134,5
4	115,6	109,7	168,2	132	157,5	164,9	139,3	145,7
5	131,4	74,7	139,5	128,1	142,6	108,4	118,5	113,8
6	145,7	132,5	133,6	144,6	134,7	146,1	116,2	137,5
7	121,5	159,6	142,7	134,6	131,7	117,1	126,3	89,5
8	131,9	169,7	143,2	93	159,3	153,6	115,6	114,8

Quadro 26A - Valores de pH e acidez dornic para amostras de leite enriquecidas com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato

Fonte de ferro *	Tratamento **	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem (horas)	Repetição	pH	Acidez Dornic
1	1	0	0	1	6,66	15
1	1	0	0	2	6,65	15
1	1	0	24	1	6,62	16
1	1	0	24	2	6,64	15
1	1	0	48	1	6,62	16
1	1	0	48	2	6,64	15
1	1	0	72	1	6,58	16
1	1	0	72	2	6,66	16
1	1	6	0	1	6,68	15
1	1	6	0	2	6,61	15
1	1	6	24	1	6,65	15
1	1	6	24	2	6,62	15
1	1	6	48	1	6,69	15
1	1	6	48	2	6,60	15
1	1	6	72	1	6,66	15
1	1	6	72	2	6,62	16
1	1	12	0	1	6,65	15
1	1	12	0	2	6,63	16
1	1	12	24	1	6,64	15
1	1	12	24	2	6,62	16
1	1	12	48	1	6,68	15
1	1	12	48	2	6,58	16
1	1	12	72	1	6,63	15
1	1	12	72	2	6,65	16
1	1	24	0	1	6,63	16
1	1	24	0	2	6,62	15
1	1	24	24	1	6,65	16
1	1	24	24	2	6,58	15
1	1	24	48	1	6,56	15
1	1	24	48	2	6,67	17
1	1	24	72	1	6,61	16
1	1	24	72	2	6,58	16

Continua...

Quadro 26A, Cont.

Fonte de ferro *	Tratamento **	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem (horas)	Repetição	PH	Acidez Dornic
1	0	0	0	1	6,66	15
1	0	0	0	2	6,67	15
1	0	0	24	1	6,66	15
1	0	0	24	2	6,65	16
1	0	0	48	1	6,67	16
1	0	0	48	2	6,63	15
1	0	0	72	1	6,63	16
1	0	0	72	2	6,62	15
1	0	6	0	1	6,70	14
1	0	6	0	2	6,62	15
1	0	6	24	1	6,68	15
1	0	6	24	2	6,63	15
1	0	6	48	1	6,64	16
1	0	6	48	2	6,67	15
1	0	6	72	1	6,61	16
1	0	6	72	2	6,64	15
1	0	12	0	1	6,61	16
1	0	12	0	2	6,69	15
1	0	12	24	1	6,65	16
1	0	12	24	2	6,63	15
1	0	12	48	1	6,65	17
1	0	12	48	2	6,57	15
1	0	12	72	1	6,57	17
1	0	12	72	2	6,63	16
1	0	24	0	1	6,65	16
1	0	24	0	2	6,65	15
1	0	24	24	1	6,63	17
1	0	24	24	2	6,64	15
1	0	24	48	1	6,64	16
1	0	24	48	2	6,57	16
1	0	24	72	1	6,61	16
1	0	24	72	2	6,57	17
2	1	0	0	1	6,64	15
2	1	0	0	2	6,62	15

Continua...

Quadro 26A, Cont.

Fonte de ferro *	Tratamento **	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem (horas)	Repetição	pH	Acidez Dornic
2	1	0	24	1	6,62	15
2	1	0	24	2	6,61	15
2	1	0	48	1	6,63	16
2	1	0	48	2	6,61	15
2	1	0	72	1	6,62	16
2	1	0	72	2	6,59	15
2	1	6	0	1	6,62	15
2	1	6	0	2	6,63	15
2	1	6	24	1	6,60	15
2	1	6	24	2	6,66	15
2	1	6	48	1	6,61	15
2	1	6	48	2	6,63	15
2	1	6	72	1	6,62	15
2	1	6	72	2	6,62	16
2	1	12	0	1	6,62	15
2	1	12	0	2	6,62	15
2	1	12	24	1	6,65	15
2	1	12	24	2	6,61	16
2	1	12	48	1	6,62	15
2	1	12	48	2	6,63	16
2	1	12	72	1	6,66	16
2	1	12	72	2	6,66	15
2	1	24	0	1	6,62	15
2	1	24	0	2	6,63	15
2	1	24	24	1	6,63	15
2	1	24	24	2	6,63	15
2	1	24	48	1	6,63	15
2	1	24	48	2	6,63	16
2	1	24	72	1	6,60	15
2	1	24	72	2	6,65	16
2	0	0	0	1	6,67	15
2	0	0	0	2	6,61	15
2	0	0	24	1	6,63	15
2	0	0	24	2	6,67	16

Continua...

Quadro 26A, Cont.

Fonte de ferro *	Tratamento **	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem (horas)	Repetição	pH	Acidez Dornic
2	0	0	48	1	6,65	16
2	0	0	48	2	6,63	15
2	0	0	72	1	6,64	16
2	0	0	72	2	6,64	16
2	0	6	0	1	6,65	16
2	0	6	0	2	6,64	15
2	0	6	24	1	6,66	16
2	0	6	24	2	6,64	15
2	0	6	48	1	6,63	16
2	0	6	48	2	6,62	15
2	0	6	72	1	6,61	16
2	0	6	72	2	6,61	16
2	0	12	0	1	6,63	15
2	0	12	0	2	6,61	15
2	0	12	24	1	6,66	16
2	0	12	24	2	6,65	15
2	0	12	48	1	6,62	16
2	0	12	48	2	6,64	15
2	0	12	72	1	6,65	16
2	0	12	72	2	6,65	15
2	0	24	0	1	6,62	16
2	0	24	0	2	6,63	15
2	0	24	24	1	6,64	16
2	0	24	24	2	6,63	15
2	0	24	48	1	6,64	15
2	0	24	48	2	6,62	16
2	0	24	72	1	6,59	16
2	0	24	72	2	6,63	16

* Fontes de ferro : (1) sulfato ferroso (2) ferro aminoácido quelato.

** Tratamento (1) homogeneizado (0) não-homogeneizado.

Quadro 27A - Valores de absorvância como expressão do índice de TBA para amostras de leite enriquecida com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato

Fontes de ferro*	Tratamento**	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem (horas)	Repetição	Absorvância
1	1	0	0	1	0,018
1	1	0	0	2	0,019
1	1	0	0	3	0,023
1	1	0	24	1	0,023
1	1	0	24	2	0,027
1	1	0	24	3	0,035
1	1	0	48	1	0,016
1	1	0	48	2	0,021
1	1	0	48	3	0,03
1	1	0	72	1	0,014
1	1	0	72	2	0,023
1	1	0	72	3	0,045
1	1	6	0	1	0,023
1	1	6	0	2	0,021
1	1	6	0	3	0,041
1	1	6	24	1	0,025
1	1	6	24	2	0,018
1	1	6	24	3	0,042
1	1	6	48	1	0,015
1	1	6	48	2	0,024
1	1	6	48	3	0,032
1	1	6	72	1	0,017
1	1	6	72	2	0,022
1	1	6	72	3	0,075
1	1	12	0	1	0,025
1	1	12	0	2	0,015
1	1	12	0	3	0,026
1	1	12	24	1	0,021
1	1	12	24	2	0,025
1	1	12	24	3	0,047
1	1	12	48	1	0,018
1	1	12	48	2	0,014
1	1	12	48	3	0,036

Continua...

Quadro 27A, Cont.

Fontes de ferro*	Tratamento**	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem (horas)	Repetição	Absorvância
1	1	12	72	1	0,025
1	1	12	72	2	0,022
1	1	12	72	3	0,074
1	1	24	0	1	0,024
1	1	24	0	2	0,013
1	1	24	0	3	0,043
1	1	24	24	1	0,028
1	1	24	24	2	0,025
1	1	24	24	3	0,059
1	1	24	48	1	0,028
1	1	24	48	2	0,033
1	1	24	48	3	0,025
1	1	24	72	1	0,022
1	1	24	72	2	0,025
1	1	24	72	3	0,076
1	0	0	0	1	0,02
1	0	0	0	2	0,019
1	0	0	0	3	0,026
1	0	0	24	1	0,021
1	0	0	24	2	0,026
1	0	0	24	3	0,013
1	0	0	48	1	0,018
1	0	0	48	2	0,018
1	0	0	48	3	0,018
1	0	0	72	1	0,012
1	0	0	72	2	0,022
1	0	0	72	3	0,018
1	0	6	0	1	0,022
1	0	6	0	2	0,022
1	0	6	0	3	0,027
1	0	6	24	1	0,03
1	0	6	24	2	0,018
1	0	6	24	3	0,025
1	0	6	48	1	0,017
1	0	6	48	2	0,016

Continua...

Quadro 27A, Cont.

Fontes de ferro*	Tratamento**	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem (horas)	Repetição	Absorvância
1	0	6	48	3	0,025
1	0	6	72	1	0,015
1	0	6	72	2	0,028
1	0	6	72	3	0,03
1	0	12	0	1	0,02
1	0	12	0	2	0,025
1	0	12	0	3	0,022
1	0	12	24	1	0,019
1	0	12	24	2	0,025
1	0	12	24	3	0,02
1	0	12	48	1	0,02
1	0	12	48	2	0,022
1	0	12	48	3	0,017
1	0	12	72	1	0,022
1	0	12	72	2	0,022
1	0	12	72	3	0,02
1	0	24	0	1	0,025
1	0	24	0	2	0,023
1	0	24	0	3	0,042
1	0	24	24	1	0,022
1	0	24	24	2	0,025
1	0	24	24	3	0,024
1	0	24	48	1	0,022
1	0	24	48	2	0,022
1	0	24	48	3	0,026
1	0	24	72	1	0,026
1	0	24	72	2	0,025
1	0	24	72	3	0,024
2	1	0	0	1	0,018
2	1	0	0	2	0,019
2	1	0	0	3	0,023
2	1	0	24	1	0,023
2	1	0	24	2	0,027
2	1	0	24	3	0,035
2	1	0	48	1	0,016

Continua...

Quadro 27A, Cont.

Fontes de ferro*	Tratamento**	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem (horas)	Repetição	Absorvância
2	1	0	48	2	0,021
2	1	0	48	3	0,03
2	1	0	72	1	0,014
2	1	0	72	2	0,023
2	1	0	72	3	0,045
2	1	6	0	1	0,025
2	1	6	0	2	0,04
2	1	6	0	3	0,024
2	1	6	24	1	0,029
2	1	6	24	2	0,032
2	1	6	24	3	0,047
2	1	6	48	1	0,012
2	1	6	48	2	0,03
2	1	6	48	3	0,029
2	1	6	72	1	0,016
2	1	6	72	2	0,025
2	1	6	72	3	0,058
2	1	12	0	1	0,026
2	1	12	0	2	0,017
2	1	12	0	3	0,029
2	1	12	24	1	0,03
2	1	12	24	2	0,03
2	1	12	24	3	0,052
2	1	12	48	1	0,017
2	1	12	48	2	0,019
2	1	12	48	3	0,034
2	1	12	72	1	0,019
2	1	12	72	2	0,066
2	1	12	72	3	0,044
2	1	24	0	1	0,017
2	1	24	0	2	0,029
2	1	24	0	3	0,029
2	1	24	24	1	0,03
2	1	24	24	2	0,057
2	1	24	24	3	0,029

Continua...

Quadro 27A, Cont.

Fontes de ferro*	Tratamento**	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem (horas)	Repetição	Absorvância
2	1	24	48	1	0,018
2	1	24	48	2	0,031
2	1	24	48	3	0,04
2	1	24	72	1	0,019
2	1	24	72	2	0,074
2	1	24	72	3	0,027
2	0	0	0	1	0,02
2	0	0	0	2	0,019
2	0	0	0	3	0,026
2	0	0	24	1	0,021
2	0	0	24	2	0,026
2	0	0	24	3	0,013
2	0	0	48	1	0,018
2	0	0	48	2	0,018
2	0	0	48	3	0,018
2	0	0	72	1	0,012
2	0	0	72	2	0,022
2	0	0	72	3	0,018
2	0	6	0	1	0,025
2	0	6	0	2	0,025
2	0	6	0	3	0,032
2	0	6	24	1	0,029
2	0	6	24	2	0,018
2	0	6	24	3	0,031
2	0	6	48	1	0,017
2	0	6	48	2	0,022
2	0	6	48	3	0,02
2	0	6	72	1	0,019
2	0	6	72	2	0,021
2	0	6	72	3	0,034
2	0	12	0	1	0,022
2	0	12	0	2	0,023
2	0	12	0	3	0,037
2	0	12	24	1	0,024
2	0	12	24	2	0,021

Continua...

Quadro 27A, Cont.

Fontes de ferro*	Tratamento**	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem (horas)	Repetição	Absorvância
2	0	12	24	3	0,035
2	0	12	48	1	0,023
2	0	12	48	2	0,021
2	0	12	48	3	0,018
2	0	12	72	1	0,017
2	0	12	72	2	0,033
2	0	12	72	3	0,023
2	0	24	0	1	0,023
2	0	24	0	2	0,03
2	0	24	0	3	0,042
2	0	24	24	1	0,031
2	0	24	24	2	0,032
2	0	24	24	3	0,022
2	0	24	48	1	0,021
2	0	24	48	2	0,037
2	0	24	48	3	0,019
2	0	24	72	1	0,019
2	0	24	72	2	0,025
2	0	24	72	3	0,026

* Fontes de ferro : (1) sulfato ferroso (2) ferro aminoácido quelato.

** Tratamento : (1) homogeneizado (0) não-homogeneizado.

Quadro 28A - Valores dos escores para sabor oxidado, atribuídos às amostras de leite enriquecidas com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato

Fontes de ferro	Tratamento	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem	Julgador	escore para sabor
1	1	0	0	1	0
1	1	0	0	2	1
1	1	0	0	3	4
1	1	0	0	4	1
1	1	0	0	5	5
1	1	0	0	6	6
1	1	0	72	1	2
1	1	0	72	2	1
1	1	0	72	3	3
1	1	0	72	4	1
1	1	0	72	5	3
1	1	0	72	6	4
1	1	6	0	1	0
1	1	6	0	2	4
1	1	6	0	3	3
1	1	6	0	4	2
1	1	6	0	5	3
1	1	6	0	6	6
1	1	6	72	1	4
1	1	6	72	2	0
1	1	6	72	3	5
1	1	6	72	4	2
1	1	6	72	5	0
1	1	6	72	6	6
1	1	12	0	1	0
1	1	12	0	2	4
1	1	12	0	3	5
1	1	12	0	4	1
1	1	12	0	5	4
1	1	12	0	6	2
1	1	12	72	1	4
1	1	12	72	2	2
1	1	12	72	3	3

Continua...

Quadro 28A, Cont.

Fontes de ferro	Tratamento	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem	Julgador	escore para sabor
1	1	12	72	4	2
1	1	12	72	5	1
1	1	12	72	6	6
1	1	24	0	1	2
1	1	24	0	2	4
1	1	24	0	3	2
1	1	24	0	4	3
1	1	24	0	5	2
1	1	24	0	6	1
1	1	24	72	1	2
1	1	24	72	2	3
1	1	24	72	3	5
1	1	24	72	4	6
1	1	24	72	5	5
1	1	24	72	6	3
1	0	0	0	1	1
1	0	0	0	2	4
1	0	0	0	3	1
1	0	0	0	4	0
1	0	0	0	5	0
1	0	0	0	6	5
1	0	0	72	1	1
1	0	0	72	2	0
1	0	0	72	3	2
1	0	0	72	4	1
1	0	0	72	5	0
1	0	0	72	6	3
1	0	6	0	1	3
1	0	6	0	2	3
1	0	6	0	3	4
1	0	6	0	4	1
1	0	6	0	5	0
1	0	6	0	6	5
1	0	6	72	1	2
1	0	6	72	2	5

Continua...

Quadro 28A, Cont.

Fontes de ferro	Tratamento	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem	Julgador	escore para sabor
1	0	6	72	3	1
1	0	6	72	4	0
1	0	6	72	5	0
1	0	6	72	6	2
1	0	12	0	1	4
1	0	12	0	2	5
1	0	12	0	3	3
1	0	12	0	4	0
1	0	12	0	5	0
1	0	12	0	6	3
1	0	12	72	1	4
1	0	12	72	2	4
1	0	12	72	3	3
1	0	12	72	4	1
1	0	12	72	5	2
1	0	12	72	6	5
1	0	24	0	1	4
1	0	24	0	2	4
1	0	24	0	3	5
1	0	24	0	4	5
1	0	24	0	5	2
1	0	24	0	6	3
1	0	24	72	1	5
1	0	24	72	2	3
1	0	24	72	3	4
1	0	24	72	4	5
1	0	24	72	5	3
1	0	24	72	6	3
2	1	0	0	1	0
2	1	0	0	2	1
2	1	0	0	3	4
2	1	0	0	4	1
2	1	0	0	5	5
2	1	0	0	6	6

Continua...

Quadro 28A, Cont.

Fontes de ferro	Tratamento	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem	Julgador	escore para sabor
2	1	0	72	1	2
2	1	0	72	2	1
2	1	0	72	3	3
2	1	0	72	4	1
2	1	0	72	5	2
2	1	0	72	6	4
2	1	6	0	1	1
2	1	6	0	2	6
2	1	6	0	3	1
2	1	6	0	4	1
2	1	6	0	5	0
2	1	6	0	6	0
2	1	6	72	1	3
2	1	6	72	2	2
2	1	6	72	3	1
2	1	6	72	4	1
2	1	6	72	5	3
2	1	6	72	6	0
2	1	12	0	1	1
2	1	12	0	2	0
2	1	12	0	3	1
2	1	12	0	4	1
2	1	12	0	5	1
2	1	12	0	6	5
2	1	12	72	1	3
2	1	12	72	2	1
2	1	12	72	3	6
2	1	12	72	4	1
2	1	12	72	5	0
2	1	12	72	6	3
2	1	24	0	1	1
2	1	24	0	2	3
2	1	24	0	3	1
2	1	24	0	4	2

Continua...

Quadro 28A, Cont.

Fontes de ferro	Tratamento	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem	Julgador	escore para sabor
2	1	24	0	5	1
2	1	24	0	6	4
2	1	24	72	1	1
2	1	24	72	2	3
2	1	24	72	3	2
2	1	24	72	4	1
2	1	24	72	5	0
2	1	24	72	6	3
2	0	0	0	1	1
2	0	0	0	2	4
2	0	0	0	3	1
2	0	0	0	4	0
2	0	0	0	5	0
2	0	0	0	6	5
2	0	0	72	1	0
2	0	0	72	2	0
2	0	0	72	3	2
2	0	0	72	4	1
2	0	0	72	5	0
2	0	0	72	6	3
2	0	6	0	1	5
2	0	6	0	2	3
2	0	6	0	3	2
2	0	6	0	4	1
2	0	6	0	5	1
2	0	6	0	6	3
2	0	6	72	1	0
2	0	6	72	2	1
2	0	6	72	3	2
2	0	6	72	4	1
2	0	6	72	5	1
2	0	6	72	6	3
2	0	12	0	1	2
2	0	12	0	2	1

Continua...

Quadro 28A, Cont.

Fontes de ferro	Tratamento	Dosagens de ferro (mg/l)	Tempo de estocagem	Julgador	escore para sabor
2	0	12	0	3	2
2	0	12	0	4	1
2	0	12	0	5	0
2	0	12	0	6	6
2	0	12	72	1	4
2	0	12	72	2	3
2	0	12	72	3	3
2	0	12	72	4	0
2	0	12	72	5	0
2	0	12	72	6	4
2	0	24	0	1	3
2	0	24	0	2	1
2	0	24	0	3	5
2	0	24	0	4	2
2	0	24	0	5	2
2	0	24	0	6	0
2	0	24	72	1	3
2	0	24	72	2	4
2	0	24	72	3	4
2	0	24	72	4	2
2	0	24	72	5	0
2	0	24	72	6	4

* Fontes de ferro : (1) sulfato ferroso (2) ferro aminoácido quelato.

** Tratamento : (1) homogeneizado (0) não-homogeneizado.