

**FABRÍCIA QUEIROZ MENDES**

**Leite em pó enriquecido com ferro: Propriedades físico-químicas,  
estabilidade oxidativa e biodisponibilidade**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL

2005

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

T

M538l  
2005

Mendes, Fabrícia Queiroz, 1977-

Leite em pó enriquecido com ferro: propriedades físico-químicas, estabilidade oxidativa e biodisponibilidade / Fabrícia Queiroz Mendes. – Viçosa : UFV, 2005. xiii, 53f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Carlos Gomes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-53.

1. Leite em pó. 2. Sulfato ferroso - Bioviabilidade. 3. Ferro aminoácido quelato - Bioviabilidade. 4. Alimentos - Composição. 5. Ferro no organismo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 637.1

A Deus.

Aos meus pais e irmãos.

Ao André.

Ao meu filho Mateus.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter tornado tudo possível.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade de realização deste curso.

Ao professor José Carlos Gomes, pela orientação, pela convivência amigável e pelo apoio.

A Capes, pelo auxílio financeiro.

À minha família, pelo apoio, amor e carinho, especialmente aos meus pais, que sempre acreditaram e apoiaram os meus estudos.

Ao André, pela paciência, compreensão, amor, carinho e dedicação, principalmente na etapa final.

Aos professores Afonso Mota Ramos e José Antônio Marques Pereira, pela atenção, sugestões e críticas apresentadas.

Às professoras Mônica Ribeiro Pirozi e Conceição Angelina dos Santos Pereira, que participaram da banca de defesa de tese, pela atenção.

À professora Mônica Ribeiro Pirozi, pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do DTA, em especial ao Thiago, pelo auxílio.

Aos muitos amigos que estiveram por perto nesse período, contribuindo com sugestões, ensinamentos, apoio, amizade e carinho. Ao Marco Antônio, Cassiano e ao Milton que me ajudaram durante o experimento. À Érica, Aline, Carmem, que sempre estiveram presentes. Em especial às amigas Elaine e Rosângela, que sempre estiveram do meu lado, mesmo distantes.

À professora Cristina Baracat, pela amizade e pelos ensinamentos.

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

## BIOGRAFIA

FABRÍCIA QUEIROZ MENDES, filha de Manoel Francisco Solano Mendes e Luzia Carvalho Queiroz Mendes, nasceu em 16 de novembro de 1977, em Teixeira, Minas Gerais.

Iniciou os estudos na Universidade Federal de Viçosa (MG) em março de 1996, obtendo o título de Engenheira de Alimentos em setembro de 2002.

Em março de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Departamento de Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

## ÍNDICE

LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Importância do ferro.....	4
2.2. Absorção, transporte e armazenamento de ferro.....	5
2.3. Recomendações diárias de ferro.....	8
2.4. Deficiência de ferro.....	9
2.5. Efeitos toxicológicos da ingestão de ferro em excesso.....	13
2.6. Enriquecimento de alimentos com ferro.....	15
2.7. O leite.....	18
2.8. Adição de ferro em leite.....	20
2.9. Compostos de ferro.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Preparo das amostras.....	26
3.2. Análises físico-químicas.....	29
3.2.1. Prova de reconstituição.....	29
3.2.2. Acidez em ácido láctico.....	29
3.2.3. Umidade.....	29
3.2.4. Teor de lipídios.....	29
3.2.5. Teor de proteínas.....	30
3.2.6. Teor de lactose.....	30
3.2.7. Teor de cinzas (Resíduo mineral fixo).....	30
3.2.8. Sedimentos.....	31
3.2.9. Teor de ferro.....	31
3.2.10. Efeito na oxidação de gordura.....	31
3.3. Biodisponibilidade <i>in vitro</i> .....	32
3.4. Análises estatísticas.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Preparo das amostras.....	34
4.2. Análises físico-químicas.....	35
4.2.1. Prova de reconstituição.....	35

4.2.2. Acidez em ácido láctico.....	35
4.2.3. Teores de umidade, lipídios, proteínas, lactose e cinzas.....	36
4.2.4. Sedimentos.....	38
4.2.5. Teor de ferro.....	38
4.2.6. Efeito na oxidação de gordura.....	39
4.3. Biodisponibilidade <i>in vitro</i> .....	41
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## LISTA DE QUADROS

1	Recomendações diárias de ferro (mg/dia).....	9
2	Composição centesimal média do leite bovino.....	19
3	Alguns compostos de ferro utilizados na fortificação de produtos lácteos....	25

## LISTA DE TABELAS

1	Resumo dos tratamentos aplicados.....	28
2	Acidez expressa em % de ácido láctico em peso, na diluição de 1:7 (1 g de amostra para 7 g de água).....	36
3	Valores médios dos teores de umidade, lipídios, proteínas, lactose e cinzas.....	37
4	Sedimentos retidos em papel de filtro após reconstituição.....	38
5	Teor de ferro determinado por espectrofotometria após reação com ortofenantrolina.....	39
6	Estabilidade oxidativa expressa pelo índice de TBA, com absorção medida a 530 nm.....	40
7	Biodisponibilidade de ferro <i>in vitro</i> e biodisponibilidade <i>in vivo</i> , deduzida a partir da equação de RAO & PRABHAVATHI.....	42

## LISTA DE FIGURAS

1	Distribuição do ferro e a relação entre os compartimentos no organismo....	5
2	Fluxograma para os tratamentos nos quais a fonte de ferro foi adicionada após a secagem do leite.....	27
3	Fluxograma para os tratamentos nos quais a fonte de ferro foi adicionada antes da secagem do leite.....	28

## RESUMO

MENDES, Fabrícia Queiroz, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2005. **Leite em pó enriquecido com ferro: Propriedades físico-químicas, estabilidade oxidativa e biodisponibilidade.** Orientador: José Carlos Gomes. Conselheiros: Afonso Mota Ramos e José Antônio Marques Pereira.

A anemia por deficiência de ferro atinge aproximadamente 36 % da população mundial, sendo crianças e gestantes os grupos mais vulneráveis. O leite bovino, alimento geralmente presente na alimentação de crianças, apresenta baixo teor e baixa biodisponibilidade de ferro. O trabalho objetivou estudar o enriquecimento de leite em pó destinado principalmente às entidades (creches e escolas) e aos programas institucionais de suplementação alimentar, para alimentação de crianças. O leite em pó foi enriquecido com duas fontes diferentes de ferro: sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato. As fontes de ferro foram adicionadas antes e após a secagem do leite. Ao leite tipo pasteurizado foi adicionado 1,5 mg de ferro por 100 mL de leite, seguido de concentração até redução de 50 % do volume e secagem em spray-dryer. Ao leite em pó foram adicionados 12 mg de ferro por 100 g de leite em pó, de forma que após reconstituição, 100 mL do produto pronto para consumo forneça 1,5 mg de ferro, equivalente a 15 % das recomendações diárias para crianças. Foram estudadas as características físico-químicas, a estabilidade oxidativa e a biodisponibilidade das fontes de ferro. A estabilidade oxidativa foi avaliada pelo índice de ácido tiobarbitúrico (TBA). A biodisponibilidade do ferro foi avaliada pelo método *in vitro* baseado na solubilidade do ferro em pH 7,5 após digestão com pepsina. Quanto à forma de enriquecimento, não houve diferença entre as características estudadas. Ambos os processos tecnológicos mostraram-se simples e de fácil execução em

laboratório. Não houve diferença entre as duas fontes de ferro nas características físico-químicas de acidez, umidade, teores de lipídios, proteínas, lactose, cinzas e sedimentos. A estabilidade oxidativa do leite enriquecido foi maior quando se utilizou ferro aminoácido quelato e ambas as fontes diferiram do controle. O ferro aminoácido quelato apresentou maior biodisponibilidade *in vitro* (31,81 %) que o sulfato ferroso (17,41 %). A biodisponibilidade *in vivo*, deduzida, foi de 15,45 % para o ferro aminoácido quelato e de 8,66 % para o sulfato ferroso. O ferro aminoácido quelato mostrou ter melhor estabilidade oxidativa e melhor biodisponibilidade comparado com o sulfato ferroso, sendo uma boa fonte para o enriquecimento do leite em pó.

## ABSTRACT

MENDES, Fabrícia Queiroz, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February of 2005. **Iron-enriched powdered milk: Physical and chemical properties, oxidative stability and bioavailability.** Adviser: José Carlos Gomes. Committee Members: Afonso Mota Ramos and José Antônio Marques Pereira.

Anemia, due to lack of iron, reaches approximately 36 % of world population; the most vulnerable are children and expectant mothers. Bovine milk, food often used for feeding children, has low rate and bioavailability of iron. The objective of this work is to study the enrichment of powdered milk, principally intended for institutions (kindergartens and schools) and nutritive supplement programs for feeding children. Powdered milk was enriched with two different sources of iron: ferrous sulfate and aminoacid chelate iron. Iron sources were added before and after milk drying. 1.5 mg of iron per 100 ml of milk were added to pasteurized milk type C, following a concentration of milk to get a reduction of 50 % from its volume, and drying in spray-dyer. 12 mg of iron were added per 100 g of powdered milk in order to obtain, after milk reconstitution, 1.5 mg of iron per 100 ml of final product that is ready to use, equal to 15 % of the recommended daily intake for children. Physical and chemical characteristics were studied, as well as oxidative stability and bioavailability of sources of iron. Oxidative stability was assessed by the thiobarbituric acid (TBA) rate. Iron bioavailability was assessed by using an *in vitro* method, based on iron solubility at pH 7,5, after digestion with pepsine. Regarding the way of enrichment, differences were not found. Both technological processes were simple and easy to perform in the laboratory. Differences between the two sources of iron were not found, in terms of physical and chemical characteristics of acidity, humidity, and lipids, proteins, lactose, ash and sediment rates. Oxidative stability of powdered milk

was greater when aminoacid chelate iron was used and both sources differed from the control. Aminoacid chelate iron showed greater bioavailability *in vitro* (31,81 %) than ferrous sulfate (17,41 %). The bioavailability deduced *in vivo*, was 15.45 % for aminoacid chelate iron and 8.66 % for ferrous sulfate. Aminoacid chelate iron revealed better oxidative stability and better bioavailability compared to ferrous sulfate, being a good source to enrich powdered milk.

## 1. INTRODUÇÃO

A deficiência de ferro é caracterizada pela diminuição da quantidade de ferro no organismo e ocorre quando o fornecimento deste mineral é insuficiente para suprir as necessidades metabólicas. Manifesta-se em três estágios: no primeiro estágio há diminuição das reservas de ferro; no segundo há um declínio no teor de ferro sérico e no terceiro estágio instala-se a anemia.

A anemia é caracterizada pela deficiência no tamanho ou no número de glóbulos vermelhos ou na quantidade de hemoglobina que elas contêm, trazendo como consequência à limitação das trocas de oxigênio e gás carbônico entre o sangue e as outras células do nosso corpo.

A anemia ferropriva, decorrente da deficiência alimentar de ferro, é a mais comum das carências nutricionais, atingindo quase dois bilhões de pessoas em todo o mundo, correspondendo a aproximadamente 36 % da população mundial (LIMA *et al.*, 2004). As crianças, nos primeiros anos de vida, e as gestantes constituem os grupos mais vulneráveis à anemia (BUONGERMINO SOUZA *et al.*, 1997).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde ([www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)), estima-se que 45 % das crianças menores de cinco anos apresentam anemia por carência de ferro assim como, 20 % dos adolescentes e 15 % a 30 % das gestantes. Porém, os estudos sobre a incidência de anemia não são muitos e a maioria deles refere-se a grupos populacionais restritos.

As consequências da anemia incluem alterações na capacidade de trabalho físico, prejuízos no desenvolvimento mental e psicomotor das crianças, aumento da mortalidade materna e infantil, baixo peso da criança ao nascer, parto prematuro e

redução da resistência às infecções (OLIVARES G & WALTER K, 2003; TUMA *et al.*, 2003).

Para a prevenção da anemia ferropriva é necessário uma alimentação bem variada, rica em alimentos que naturalmente possuem ferro. As melhores fontes naturais de ferro são os alimentos de origem animal - fígado e carnes de qualquer animal - pelo fato de possuírem ferro tipo heme, que é mais bem aproveitado pelo nosso organismo. Entre os alimentos de origem vegetal, destacam-se: as leguminosas, os cereais integrais ou enriquecidos, as nozes, castanhas e as hortaliças. O ferro dos alimentos de origem vegetal apresenta menor absorção em relação aos de origem animal. Portanto, para melhorar essa absorção é necessário o consumo de alimentos "estimulantes", como carnes e alimentos com alto teor de vitamina C na mesma refeição (CARDOSO & PENTEADO, 1994).

Entretanto, modificações da dieta nem sempre são possíveis por limitações econômicas ou hábitos culturais enraizados. Sendo assim, torna-se necessária a suplementação com ferro ou a fortificação de alimentos como forma de controlar a deficiência de ferro (SOGLIA, 1996).

A fortificação de alimentos tem sido considerada como a melhor forma de prevenir a deficiência de ferro, quando a dieta não fornece a quantidade necessária deste mineral. Sua principal vantagem é que o consumo destes produtos não requer participação ativa do sujeito, como mudanças nos hábitos de consumo.

Entretanto, alguns fatores devem ser levados em consideração antes da fortificação de algum alimento com ferro, como a biodisponibilidade da forma do ferro escolhida, o consumo do alimento pela população alvo e não ocorrência de alterações no alimento como modificação da cor, desenvolvimento de sabor estranho e sedimentação de compostos pouco solúveis (SOGLIA, 1996).

Atualmente, a creche é uma necessidade em nossa sociedade, como forma de educar e de socializar a criança e como serviço complementar à família, uma vez que as mulheres cada vez mais ingressam no mercado de trabalho em busca de incremento para a renda familiar, autonomia financeira e realização profissional (SOUZA, 1998).

SOUZA (1998), a partir de observações e pesagens das refeições servidas às crianças em duas creches, verificou uma não adequação das necessidades diárias de ferro na alimentação das crianças, considerando que a alimentação na creche

deveria suprir 80 % das necessidades diárias das crianças. A alimentação fornecida às crianças fornecia apenas 4 mg de ferro por dia, ou seja, 50 % da dose adequada.

A mesma percentagem de adequação para o ferro (50 %) foi observado por SILVA et al. (2002) em creches, antes de uma intervenção com bebida láctea fermentada e fortificada com ferro. Neste estudo, também se verificou que a percentagem de adequação às necessidades diárias de cálcio foi de 37,6 %, evidenciando a necessidade e importância da utilização do leite e seus derivados como veículo de fortificação, uma vez que este alimento é uma fonte de cálcio e tem boa aceitação pelas crianças.

Desta forma, o objetivo geral do presente trabalho foi estudar o enriquecimento de leite em pó com ferro destinado, principalmente, às entidades (creches, escolas) e aos programas institucionais de suplementação alimentar, para alimentação de crianças.

Especificamente, pretendeu-se:

- Desenvolver um leite em pó enriquecido com ferro;
- Verificar as características físico-químicas do produto;
- Verificar a presença de resíduos indesejáveis após reconstituição do leite.
- Determinar o efeito da adição de ferro na oxidação de gordura do leite em pó desenvolvido;
- Determinar a biodisponibilidade do leite em pó enriquecido com ferro;

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Importância do ferro

O ferro é o segundo metal mais abundante na crosta terrestre, existindo em dois estados de valência: ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) (FAIRWEATHER-TAIT, 1995a). Apresenta massa atômica de 55,847 g/mol. É essencial para todas as formas vivas, com exceção de certas bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bacillus*. Nesses organismos, as funções do ferro são desempenhadas por outros minerais, como manganês e cobalto (BEARD et al., 1996).

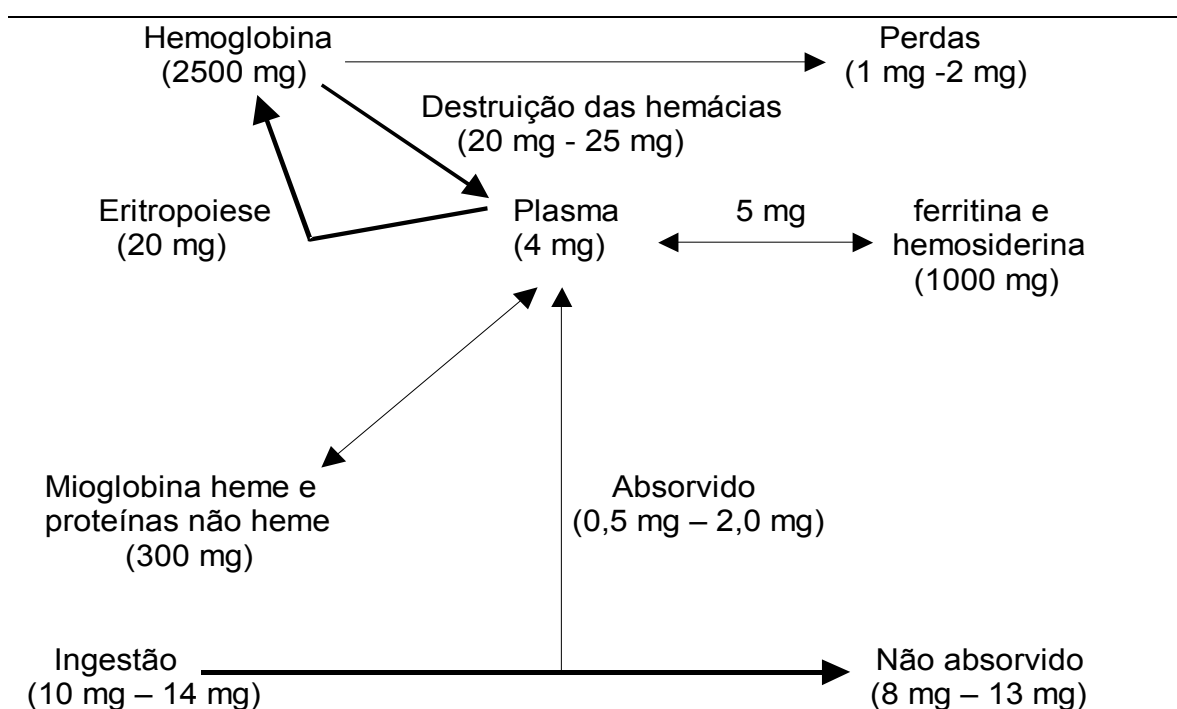
Dentre os microelementos, é o que possui a função biológica mais conhecida. Está presente nos grupos heme das hemácias, essencial no processo de transporte de  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ , da mioglobina, reserva de oxigênio no músculo (SAKAMOTO, 2003), e também nas proteínas transportadoras de elétrons das mitocôndrias. É componente de diversas enzimas que contêm o grupo prostético heme, como citocromo oxidase, catalase e peroxidase e de outras como o NADH desidrogenase e a ubiquinase, porém não na forma heme (NELSON & COX, 2002). É indispensável para a síntese e manutenção da mielina (OLIVARES G & WALTER K, 2003), síntese e degradação de neurotransmissores, síntese protéica, organogênese (BEARD & PIÑERO, 1998) e funcionamento do sistema imunológico (SAKAMOTO, 2003)

Um indivíduo humano adulto possui cerca de 3,5 g a 4,5 g de ferro no organismo, tanto na forma orgânica como inorgânica (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). As concentrações variam em função da idade, sexo, tecido ou órgão (SAKAMOTO, 2003). Deste total 71 % a 84 % são considerados ferros

funcionais e se encontram presentes em enzimas e proteínas, em maior parte nas hemoglobinas (60 % a 70 %) e mioglobinas (10 % a 12 %). O restante está na forma de ferritina e hemosiderina, armazenados no fígado, no baço e na medula óssea (MAHAN & ARLIN, 1998).

O ferro do organismo tem dupla origem: ferro exógeno, ingerido com os alimentos e ferro endógeno, proveniente da destruição das hemácias, que libera cerca de 20 a 25 mg do metal diariamente, sendo em seguida reutilizado (MANGUEIRA et al., 2002).

A Figura 1 demonstra a variação das quantidades de ferro nos diversos compartimentos do organismo humano normal.



Adaptado de SAKAMOTO (2003)

FIGURA 1: Distribuição do ferro e a relação entre os compartimentos no organismo.

## 2.2. Absorção, transporte e armazenamento de ferro

A capacidade do organismo em excretar o ferro é extremamente limitada, sendo a absorção controlada a fim de evitar o excesso, pois tanto um suprimento inadequado como o acúmulo deste nutriente é prejudicial ao organismo. Este

recurso homeostático também opera em sentido contrário, aumentando a eficiência da absorção nos casos de escassez ou de necessidades aumentadas. Em condições normais um ótimo padrão alimentar contém entre 10 mg e 20 mg de ferro, dos quais o organismo absorve 5 % a 10 %. Esta absorção compensa a perda de ferro do organismo através da descamação de células, da bile, verminoses, sangramentos acidentais e sangramento menstrual, em mulheres (BRIGIDE, 2002; LOPES et al, 1999; FAIRWEATHER-TAIT, 1995b; SILVA, 1994; KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Cerca de 90 % do ferro dos alimentos está na forma de sais de ferro, denominado ferro não-heme. Os outros 10 % do ferro da dieta estão na forma de ferro heme proveniente principalmente da hemoglobina e da mioglobina (CARDOSO & PENTEADO, 1994). Ferro heme e não-heme são absorvidos de forma diferente, com diferentes níveis de eficiência, dependendo da forma química, outros constituintes da dieta e níveis de ferro no organismo (FAIRWEATHER-TAIT, 1995b)

A absorção de ferro pode ocorrer a partir do estômago e por toda a totalidade do intestino delgado, sendo a maior absorção na parte superior deste (PASMORE et al., 1986). Apesar da absorção a nível gástrico ser pequena, o estômago libera ácido clorídrico e gastrina, ajudando a liberar o ferro do complexo ferro-proteína e solubilizando-o ao reduzi-lo da forma férrica para a ferrosa. No intestino, a oxidação do ferro é favorecida pela elevação do pH, devido à presença de bicarbonato, diminuindo a absorção. Porém, a presença de enzimas pancreáticas favorece a liberação do ferro dos complexos ferro-proteína, através da hidrólise das proteínas, tornando-o disponível para absorção (MARTINI, 2002).

A absorção do ferro não-heme acontece por transporte transcelular ou paracelular. O transporte transcelular controla a absorção de ferro, depende de energia e representa a via regulada e mediada por carregadores. O transporte paracelular, através de canais existentes entre as células da mucosa intestinal, ocorre por difusão passiva e depende da diferença de concentração do ferro existente no lúmen intestinal e no plasma. Ocorre em menor intensidade, mas quando a quantidade de ferro na dieta é alta, quantidades significantes podem ser absorvidas por esta via, visto que não há regulação (SAKAMOTO, 2003; YBARRA et al., 2001; BEARD et al., 1996; FAIRWEATHER-TAIT, 1995b)

O grau de absorção por transporte transcelular do ferro não-heme é altamente variável e depende das reservas de ferro do indivíduo e de outros

componentes da dieta (CARDOSO & PENTEADO, 1994). Os sais de ferro são quebrados durante a digestão liberando o ferro não-heme, que permite a sua redução parcial. Esta redução é facilitada por fatores endógenos como o ácido clorídrico, secreções gástricas e constituintes da dieta. A absorção do ferro ocorre em três etapas: passagem pela membrana apical do enterócito, transporte pelo citosol e liberação na circulação através da membrana basolateral (YBARRA et al., 2001).

Os constituintes da dieta que interferem na biodisponibilidade do ferro não-heme podem ser classificados em estimuladores e inibidores da absorção de ferro. Entre os fatores estimuladores da dieta estão as carnes e os ácidos orgânicos como o cítrico, málico, tartárico, láctico e, principalmente, o ácido ascórbico. O efeito da carne como estimulador relaciona-se especificamente à proteína muscular. O mecanismo não foi completamente esclarecido, mas pode estar relacionado à liberação de cisteína e de peptídios com cisteína durante o processo de digestão, formando quelatos peptídio-ferro de fácil absorção. O ácido ascórbico converte o ferro férrico em ferroso, tornando-o solúvel no meio alcalino do intestino delgado. Além disso, no pH ácido do estômago, o ácido ascórbico forma um quelato com o cloreto férrico, que permanece estável em pH alcalino. A suplementação com ácido ascórbico tem sido sugerida para melhorar a biodisponibilidade de ferro da dieta e aumentar as reservas orgânicas de ferro em mulheres em idade reprodutiva (CARDOSO & PENTEADO, 1994).

Entre os inibidores da absorção estão os polifenóis, fitatos, fosfatos e oxalatos. Os polifenóis são metabólitos secundários de origem vegetal, ricos em grupos hidroxil fenólicos que formam complexos insolúveis com ferro. Polifenóis de alto peso molecular, os taninos, presentes no chá e no café, são os maiores inibidores da absorção de ferro dos alimentos. O cálcio, em pequenas quantidades, parece aumentar a absorção de ferro, mas grandes quantidades inibem a absorção. Os fosfatos, ligados ou não a proteínas, formam complexos insolúveis com ferro e são os principais responsáveis pela baixa biodisponibilidade do ferro dos ovos, leite e derivados. Os fitatos, presentes em muitos cereais, inibem a absorção do ferro não-heme da dieta através da formação de complexo insolúvel de fitato di e tetra-férrico (CARDOSO & PENTEADO, 1994).

O ferro heme é prontamente absorvido pela mucosa intestinal com subsequente liberação do ferro dentro das células da mucosa (PINEDA et al., 1994)

e seu nível de absorção é pouco influenciado pelas reservas orgânicas de ferro ou por outros constituintes da dieta (CARDOSO & PENTEADO, 1994).

A passagem do ferro através do citosol do enterócito ocorre com a atuação de chaperonas e da enzima mobilferrina, que embora tenha maior afinidade pelo ferro, também pode se ligar a outros íons divalentes, como cálcio, cobre, zinco e chumbo (YBARRA, 2001). Posteriormente é liberado na forma ferrosa e atravessa a membrana basolateral, caindo na corrente sanguínea (SAKAMOTO, 2003).

Após a liberação na circulação, o ferro liga-se a transferrina, uma glicoproteína responsável pelo transporte de ferro no organismo. O ferro é então levado aos estoques, tais como fígado e baço, para a medula óssea, onde é incorporado à hemoglobina, assim como para os tecidos que precisam de ferro (MACPHAIL, 2001). O ferro não utilizado pelo organismo é armazenado no parênquima hepático, como ferritina (MIRANDA, 1999).

Ao fim da vida das células vermelhas, cerca de 120 dias, estas são fagocitadas por células do retículo endotelial, principalmente no fígado e no baço. O ferro é separado do grupo heme e armazenado sob a forma de ferritina ou hemosiderina ou liberado na corrente sanguínea, ligando-se a transferrina (MACPHAIL, 2001).

### **2.3. Recomendações diárias de ferro**

Os estoques de ferro no organismo são controlados através da absorção, que deve compensar a perda diária de ferro. Em um homem adulto as perdas de ferro são de aproximadamente 1,0 mg por dia devido a sangramentos, descamação de células intestinais e epiteliais, perdas na bile e na urina. Em mulheres em período fértil, há perdas adicionais de 0,5 mg de ferro por dia devido à menstruação (MACPHAIL, 2001).

Considerando a perda diária para um homem adulto de 1,0 mg de ferro por dia e que a média de absorção de ferro presente em uma dieta é de 10 %, uma porção diária de 10 mg de ferro atenderá as necessidades de um homem adulto (PASSMORE et al., 1986). O consumo recomendado de ferro para os diferentes grupos de idade é apresentado no Quadro 1.

QUADRO 1: Recomendações diárias de ferro (mg/dia)

Idade	Ferro (mg/dia)
<b>Crianças</b>	
0-5 meses	6
5-12 meses	10
1-3 anos	10
4-10 anos	10
<b>Mulheres</b>	
11-50 anos	15
> 51 anos	10
Gravidez	30
Lactação	15
<b>Homens</b>	
11-18 anos	12
> 19 anos	10

Fonte: NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC, 1989)

## 2.4. Deficiência de ferro

A deficiência de ferro é um estado no qual há redução da quantidade total de ferro e o fornecimento de ferro é insuficiente para atingir as necessidades de diferentes tecidos, incluindo as necessidades para formação de hemoglobina dos eritrócitos (CARDOSO & PENTEADO, 1994).

A deficiência de ferro desenvolve-se no organismo em três estágios, cada um mudando gradativamente para o outro, de acordo com a gravidade da deficiência. No primeiro estágio, há diminuição da ferritina, que está diretamente relacionada com as reservas de ferro. No segundo estágio, há um declínio da concentração de ferro sérico, a saturação da transferrina está diminuída e aumento da capacidade de ligação do ferro, a eritropoiese se torna deficiente, com diminuição do aporte de ferro para órgãos e tecidos. O terceiro estágio se caracteriza pela redução da hemoglobina, microcitose e hipocromia, instalando-se a anemia (BARBOSA & CARDOSO, 2003; HEDLER et al., 2002; SIMÕES et al., 1999).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as anemias nutricionais são o estado no qual a concentração de hemoglobina sanguínea é baixa em consequência da deficiência de um ou mais nutrientes. Assim, a anemia nutricional ocorre devido à incapacidade do tecido eritropoiético em manter os níveis

de hemoglobina normais. Dentre as anemias nutricionais, a deficiência de ferro é citada como a principal causa, sendo dez vezes mais prevalente que a deficiência de folato (SILVA, 2003).

Considerando a distribuição normal dos níveis de hemoglobina em uma população, a anemia ferropriva é detectada quando os níveis de hemoglobina individuais estão abaixo de -2 desvios-padrão da distribuição média de uma população de referência com adequadas condições de saúde e nutrição, com mesma idade, sexo e mesma altitude. Quando a prevalência dos níveis de hemoglobina menores que -2 desvios-padrão ultrapassa 5 %, a anemia ferropriva é considerada um problema de saúde pública. (UNICEF/UNU/WHO/MI, 1998 citados por SILVA, 2003).

A anemia por deficiência de ferro é a mais comum das carências nutricionais, atingindo quase dois bilhões de pessoas no mundo todo, correspondendo a aproximadamente 36 % da população mundial (LIMA et al., 2004), sendo que 75 % dos casos ocorrem nos países em desenvolvimento (MUSLIMATUM, 2001).

Dados da OMS mostram que as populações da África e do sul da Ásia apresentam as maiores prevalências. Com exceção de adultos do sexo masculino, a prevalência nessas regiões está acima de 40 %. Na América Latina a prevalência de anemia é menor, variando de 13 % entre homens adultos a 30 % entre gestantes (BUONGERMINO SOUZA et al., 1997).

Considerando que a anemia é o último estágio da deficiência de ferro, estima-se que pode haver na população pelo menos o mesmo número de casos de deficiência sem instalação do quadro de anemia, ampliando, de forma contundente, a magnitude dessa doença em nível mundial (TUMA et al., 2003).

As crianças, nos primeiros anos de vida, e as gestantes constituem os grupos mais vulneráveis à anemia. Para esses, a OMS apresenta prevalência estimada de 43 % e 51 %, respectivamente. Vários estudos, realizados em diversas regiões do mundo, corroboram esta estimativa (BUONGERMINO SOUZA et al., 1997).

No Brasil, os estudos sobre anemia não são muitos e a maioria deles refere-se a grupos populacionais restritos. Os resultados encontrados permitem supor a existência de elevada prevalência no Brasil (BUONGERMINO SOUZA et al., 1997).

SOARES et al. (2000), estudando crianças menores de 12 meses, em dois bairros periféricos de Fortaleza, CE, registraram prevalência de 60 %. Foram registradas prevalências de 58 % em Maringá, PR, em crianças de até um ano

(UCHIMURA et al., 2003) e de 54 % em Criciúma, SC, para crianças de seis meses a três anos (NEUMAN et al., 2000). Em Caldeiras, RO, foi registrada uma prevalência de 28,8 % para a população, sendo que para crianças até 12 meses de idade esta prevalência era de 74 % (CARDOSO et al., 1992). MONTEIRO et al. (2000) encontraram 46,9 % de crianças anêmicas até 59 meses, no município de São Paulo, SP. Neste mesmo estudo, foi observado um aumento de cerca de 25 % na prevalência de anemia durante o período de 1984/85 a 1995/96. A faixa etária inferior a 24 meses é citada, na maioria das pesquisas, como o grupo que apresenta maiores prevalências (UCHIMURA et al., 2003; SOARES et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000; CARDOSO et al., 1992).

No município de Viçosa, MG, SILVA (2003), em estudos com lactentes, verificou uma frequência de 57,2 % de anemia ferropriva no primeiro ano de vida, entre os anêmicos, 39,9 % foram considerados de anemia grave. MIRANDA et al. (2003), estudando crianças de 12 meses a 60 meses, registraram prevalência de 63,2 % de anemia e 43,5 % de anemia grave.

Na infância, a deficiência de ferro é originada pela dificuldade em suprir os requerimentos deste mineral por uma dieta exclusivamente láctea. A predisposição ao desenvolvimento da anemia é maior em prematuros devido a seus menores requerimentos de ferro ao nascer. Esta susceptibilidade também é maior em crianças com lactação artificial (OLIVARES G, WALTER K, 2003), pois tanto o leite humano quanto o leite de vaca contém cerca de 0,5 mg a 1,0 mg de ferro/L, porém possuem biodisponibilidades diferentes. A absorção do ferro do leite humano (cerca de 50 %) é exclusivamente alta, o que compensa sua baixa concentração. Por outro lado, somente cerca de 10 % do ferro do leite bovino é absorvido. Acredita-se que a baixa biodisponibilidade do ferro do leite bovino esteja relacionada à alta concentração de cálcio e fosfoproteínas, juntamente com a baixa concentração de vitamina C, em relação à composição química do leite humano (CARDOSO & PENTEADO, 1994).

Em países tropicais, a perda crônica de sangue por infecções parasitárias pode contribuir para um aumento na incidência de casos de deficiência de ferro. Em regiões endêmicas de malária há um aumento de incidência de anemia (OLIVARES G & WALTER K, 2003) durante a doença aguda e na fase de recuperação da infecção, quando parecem atuar mecanismos auto-imunes ainda pouco esclarecidos. Os parasitas do gênero *Plasmodium* instalam-se nos eritrócitos,

provocando hemólise e utilizando ferro-heme para sua nutrição (CARDOSO et al, 1992).

As manifestações da carência de ferro derivam daquelas próprias da anemia e de outras não hematológicas causadas por mau funcionamento das enzimas ferro dependentes (OLIVARES G & WALTER K, 2003). Pode resultar em alterações na capacidade de trabalho físico, prejuízos no desenvolvimento mental e psicomotor das crianças, aumento da mortalidade materna e infantil, baixo peso da criança ao nascer, parto prematuro e redução da resistência às infecções (OLIVARES G & WALTER K, 2003; TUMA et al., 2003).

O maior período de crescimento cerebral e formação de novas conexões neurais coincide com o período de maior prevalência de anemia (BARBOSA & CARDOSO, 2003), portanto, a deficiência ferropriva na infância produz atraso no desenvolvimento psicomotor. Estes efeitos persistem até aos dez anos e parecem não serem reversíveis em longo prazo, mesmo com tratamento oportuno (OLIVARES G & WALTER K, 2003).

O tipo predominante de células que contém ferro no cérebro de ratos, macacos, porcos e no cérebro humano são os oligodendrócitos, responsáveis pela produção de mielina (BEARD & PIÑERO, 1998). As anomalias na mielinização podem explicar alterações vistas em funções mais complexas como o comportamento e os déficits cognitivos, principalmente deficiência da motricidade e aprendizado (OLIVARES G & WALTER K, 2003).

Há evidências, em ratos, entre deficiência de ferro e redução de neurotransmissores (HORTON & ROSS, 2003). O ferro é cofator de algumas enzimas envolvidas na síntese de neurotransmissores, incluindo serotonina, norepinefrina e dopamina (BEARD & PIÑERO, 1998).

HORTON & ROSS (2003), em cálculo ilustrativo feito em dez países em desenvolvimento, sugeriram que o valor anual da perda de produtividade física causada por deficiência de ferro é de 2,32 dólares per capita. As perdas totais, considerando prejuízos no desenvolvimento físico e cognitivo, são de 16,73 dólares per capita.

## 2.5. Efeitos toxicológicos da ingestão de ferro em excesso

Toxicidade aguda provocada por ferro é uma condição pouco freqüente, mas altos conteúdos de ferro nos tecidos tem sido associado com condições patológicas severas e pode ocorrer devido à ingestão acidental de ferro medicinal, administração parenteral de ferro, alto conteúdo de ferro na dieta, frequentes transfusões sanguíneas ou aumento da absorção causada por desordens genéticas (FRAGA & OTEIZA, 2002; HEIMBACK et al., 2000; WARD, 1995).

Os sintomas da toxicidade de ferro incluem letargia, náuseas e vômitos, dores abdominais, fezes escuras, danos ao fígado e problemas na coagulação dias após a ingestão. Efeitos tardios incluem falência renal e cirrose hepática (HEIMBACK et al., 2000).

Em crianças menores de seis meses de idade a suplementação com ferro pode levar a super dosagem de ferro. Segundo LEONG et al. (2003), ratos recém nascidos são incapazes de controlar a absorção de ferro em resposta a uma suplementação. Como consequência, o ferro se acumula em alguns tecidos, causando danos oxidativos aos tecidos durante a fase de desenvolvimento.

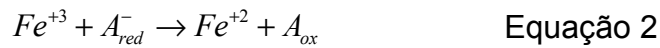
A toxicidade causada por administração durante um longo período é mais comum em adultos do que em crianças. Ocorre geralmente em indivíduos com desordens metabólicas genéticas que afetam o balanço de ferro ou submetidos a exposições excessivas. Evidências sugerem que indivíduos normais sejam capazes controlar a absorção de ferro mesmo com altas ingestões deste mineral e só indivíduos com desordens metabólicas que aumentam a absorção férrea é que possuem risco de desenvolverem uma overdose de ferro (HEIMBACK et al., 2000). A hemocromatose hereditária, um erro congênito do metabolismo de ferro, aumenta a absorção mesmo em níveis adequados de ferro no organismo. Pode levar à cirrose, diabetes mellitus e disfunção endócrina (WARD, 1995).

Há estudos indicando a possibilidade de altos níveis de ferro estarem associados ao risco de infarto do miocárdio e câncer (THURNHAM, 1995).

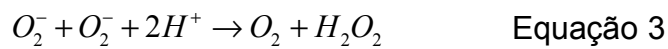
As alterações na estrutura em função das células causadas por overdose de ferro tem sido relacionados aos danos mediados por radicais livres nos componentes celulares. Na forma de íon ferroso ( $Fe^{+2}$ ), o ferro reduz o oxigênio molecular ( $O_2$ ) a radical superóxido ( $O_2^-$ ):



Antioxidantes podem reduzir o íon férrico ( $Fe^{+3}$ ) a íon ferroso ( $Fe^{+2}$ ):



Duas moléculas de superóxido formam oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou por catálise enzimática:



O íon ferroso ( $Fe^{+2}$ ) pode catalisar a decomposição de peróxidos, hidroperóxidos (equação 4) ou peróxidos orgânicos (equação 5), formando radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ).



O radical hidroxil formado ( $OH^\bullet$ ) pode, subseqüentemente, iniciar a oxidação de lipídios ou outras moléculas presentes no sistema biológico (FRAGA & OTEIZA, 2002).

Em situações de overdose de ferro, este está presente no plasma e tecidos em formas anormais. Estudos bioquímicos têm mostrado que estas formas de ferro podem desenvolver o câncer por iniciar ou promover o crescimento de células cancerosas (NELSON, 1995).

Antioxidantes podem prevenir a toxicidade provocada pelo ferro por formar quelatos com o íon ferroso ( $Fe^{+2}$ ), impedindo a reação com oxigênio molecular ou por formar quelatos com o ferro, mantendo-o na forma férrica ( $Fe^{+3}$ ), incapaz de reduzir o oxigênio (FRAGA & OTEIZA, 2002).

Muitas substâncias com a capacidade de formar quelatos com o ferro estão presentes em sistemas biológicos. As proteínas que participam do metabolismo de ferro podem seqüestrar o ferro impedindo sua participação na formação de radicais livres. Ferritina, transferrina e diversas enzimas contendo ferro, como a catalase, mantêm o ferro na forma férrica, tornando-o menos reativo a iniciar ou propagar a formação de radicais livres. Diversos outros componentes, naturais ou sintéticos, podem formar quelatos com o ferro e limitar sua participação nas reações de formação de radicais livres. Por exemplo, vitamina E, uma mistura de vários tocoferóis e tocotrienóis, e vitamina C, ácido ascórbico, presentes normalmente na dieta ou obtidos por suplementação, podem formar quelatos com ferro. Os flavonóides, compostos polifenólicos sintetizados por plantas, podem reduzir os efeitos da toxicidade do ferro por formar quelatos ou pela capacidade de capturarem radicais livres (FRAGA & OTEIZA, 2002).

## **2.6. Enriquecimento de alimentos com ferro**

Durante as últimas décadas, por diversos fatores, o ser humano vem modificando seus hábitos alimentares. A baixa ingestão quantitativa de alimentos, principalmente de origem animal, a má qualidade da dieta e hábitos alimentares restritos ou errôneos tem gerado quadros de deficiência energético-proteica e mínero-vitamínica (SOGLIA, 1996).

A deficiência de ferro pode ser prevenida mediante modificações da dieta, fortificação de alimentos e suplementação com ferro. A forma ideal de prevenir a carência de ferro seria uma dieta adequada, o que nem sempre é possível por limitações econômicas ou hábitos culturais enraizados. As modificações na dieta incluem aumentar o consumo de alimentos ricos em substâncias que favoreçam a absorção de ferro não-heme, diminuir o consumo de inibidores da absorção e aumentar o consumo de ferro heme (OLIVARES G & WALTER K, 2003).

A suplementação com ferro, pelo uso de medicamentos, tem sido a principal estratégia usada no controle da anemia ferropriva. A suplementação alimentar requer acompanhamento médico e isto pode dificultar o tratamento em muitas regiões. Além disto, outros fatores contribuem para a ineficácia da suplementação

como doses inadequadas e tempo de suplementação insuficiente (VITERI, citado por MARTINI, 2002). Os efeitos colaterais como diarreia, constipação, desconforto gástrico, cólicas, pirose e náusea ocorrem em 15 % a 20 % dos pacientes em tratamento diário com ferro oral e contribuem para o abandono do tratamento, além da longa duração do mesmo (SOUZA & FILHO, 2003; LOPES et al, 1999).

A suplementação medicamentosa, apesar de eficiente do ponto de vista de recuperação das condições hematológicas, apresenta entraves operacionais, como a baixa aderência da população e o não oferecimento do fármaco diariamente (TORRES et al., 1994).

A fortificação de alimentos com ferro é a forma mais prática de prevenir a carência de ferro a baixo custo e longo prazo em grupos de população. Sua principal vantagem é que o consumo destes produtos não requer participação ativa do sujeito, como mudanças nos hábitos de consumo (BOVELL-BENJAMIN & GUINARD, 2003; OLIVARES G & WALTER K, 2003). A fortificação não substitui necessariamente a suplementação com ferro nem as orientações sobre modificações da dieta, mas, se efetiva em longo prazo, pode aumentar as reservas de ferro de uma população. A suplementação deve ser recomendada quando há necessidade de uma grande quantidade de ferro em um curto período de tempo, como na gravidez, por exemplo. (OLIVARES G & WALTER K, 2003; CARDOSO & PENTEADO, 1994).

A legislação brasileira considera alimento fortificado, enriquecido ou simplesmente adicionado de nutrientes todo alimento ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo e ou prevenir ou corrigir deficiências demonstradas em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma. A legislação alerta que o nutriente deve estar presente em concentrações que não impliquem ingestão excessiva ou insignificante do nutriente adicionado, considerando as quantidades derivadas de outros alimentos da dieta e as necessidades do consumidor a que se destina (BRASIL, 1998).

Para alimentos enriquecidos ou fortificados é permitido o enriquecimento ou fortificação desde que 100 mL ou 100 g do produto, pronto para consumo, forneçam no mínimo 15 % da IDR de referência, no caso de líquidos, e 30 % da IDR de referência, no caso de sólidos (BRASIL, 1998).

A partir de junho de 2004, tornou-se obrigatório, pela Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, a fortificação das farinhas de trigo e milho pré-embaladas na ausência do cliente prontas para oferta ao consumidor e as destinadas ao uso industrial com, no mínimo, 4,2 miligramas de ferro e 150 microgramas de ácido fólico por 100 gramas de farinha. As farinhas utilizadas como ingredientes em produtos alimentícios onde comprovadamente o ferro ou o ácido fólico causem interferência poderão ser isentas de ferro ou ácido fólico. A escolha dos compostos de ferro para a fortificação é de responsabilidade das indústrias, que devem garantir a estabilidade do produto dentro do prazo de validade do mesmo e assegurar que os compostos de ferro sejam biodisponíveis (BRASIL, 2002).

O alcance da fortificação de alimentos com ferro é extremamente grande e, para sua efetividade, alguns fatores devem ser considerados (NAME & GUERRA, 2002):

- O consumo médio diário do alimento pelo grupo em questão;
- A quantidade do nutriente presente na fração consumida;
- A biodisponibilidade do composto de ferro adicionado.

A disponibilidade do ferro usados em suplementos ou compostos para enriquecer alimentos varia de acordo com a composição química (MAHAN & ARLIN, 1998).

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 (SOGLIA, 1996).

No Chile, por lei, a farinha de trigo é fortificada com 30 mg/kg, desde a década de 1950 e a partir da década de 1980 o Programa Nacional de Alimentación Complementaria (PNAC) passou a distribuir leite enriquecido com ferro. Em um estudo realizado com pré-escolares em Pintana, Chile, DIAZ A et al. (2002) verificaram que 68,8 % das crianças consomem leite enriquecido com ferro distribuído pelo PNAC e 97,9 % consomem pão diariamente, sendo o consumo médio de 1,1 pães por dia. Dentre estas crianças, 1 % apresentaram anemia, 1 % eritropoiese deficiente e 5 % apresentaram depósitos de ferro depletados. Em 1975, a prevalência de anemia no Chile era de 18,8 % (DIAZ A, 2002).

MARCHI et al. (2003) verificaram o efeito da intervenção de arroz fortificado com ferro em 64 crianças pré-escolares em creches assistenciais em São Paulo,

SP. Durante três meses foi oferecido às crianças arroz fortificado com ferro aminoácido quelato na quantidade de 2,1 mg de ferro por 100 g de arroz cozido. A proporção de anêmicos declinou de 40,6 % para 25 %.

Em Londrina, Paraná, MIGLIORANZA et al. (2003) forneceram a 467 crianças, de 7 anos a 14 anos, uma bebida à base de soro de leite contendo 15 % de polpa de morango congelada, fortificada com ferro aminoácido quelato, vitaminas A e D. Cada 100 mL da bebida continha 12 mg de ferro. Inicialmente, a prevalência de anemia era de 41,9 %. Após seis meses, decresceu para 26,4 % e ao final de um ano, para 9,6 %. O incremento médio de hemoglobina, após um ano de oferecimento da bebida enriquecida, foi de 2,2 g/dL para aqueles que apresentavam, inicialmente, níveis de hemoglobina inferiores a 11 g/dL; 1,32 g/dL para aquelas com níveis de hemoglobina entre 11 g/dL e 12 g/dL e 0,35 g/dL para aqueles com níveis de hemoglobina superiores a 12 g/dL.

Para sucesso da fortificação é importante, além da biodisponibilidade da forma de ferro utilizada e do veículo de fortificação, a avaliação sensorial. A fortificação com ferro pode causar problemas com oxidação de lipídios, estabilidade e aceitação de consumo. Ocorrem, também, reações entre ferro e componentes naturais presentes em alimentos como antocianinas, taninos e flavonóides. Formas biodisponíveis de ferro podem catalisar a oxidação de lipídios, causando rancidez e alterações no sabor. Sais de ferro podem se oxidar formando óxidos coloridos ou reagirem com compostos sulfurados ou taninos, formando complexos azul-escuro (BOVELL-BENJAMIN & GUINARD, 2003).

## **2.7. O leite**

O leite bovino é uma secreção branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado (BEHMER, 1995). A cor branca do leite é resultante da dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio. A cor amarelada é devido ao pigmento lipossolúvel carotenóide (SILVA et al., 1997).

Constitui-se de um sistema polidisperso, com pH entre 6,5 e 6,7. Neste sistema, a gordura encontra-se em emulsão, as proteínas se encontram de forma

bem dispersa e formando um colóide em forma de micelas e a lactose, principal carboidrato do leite, se encontra em solução (SCHLIMME & BUCHHEIM, 2002).

A composição do leite bovino varia com a raça, idade, estágio da lactação, alimentação, manejo e condições sanitárias do animal (SCHLIMME & BUCHHEIM, 2002). A composição percentual média do leite de diferentes raças, segundo SILVA et al. (1997), está descrita na Quadro 2.

QUADRO 2: Composição centesimal média do leite bovino.

Constituintes	Teor (% em peso)	Variação (% em peso)
Água	87,30	85,5-88,7
Extrato seco desengordurado	8,80	7,9-10,0
Gordura	3,90	2,4-5,5
Lactose (carboidratos)	4,60	3,8-5,3
Proteínas	3,25	2,3-4,4
Sais minerais (cinzas)	0,65	0,53-0,80

Fonte: SILVA et al, 1997.

A lactose, formada por glicose e galactose, é o principal carboidrato do leite, sendo responsável pelo sabor levemente adocicado (MACHADO et al., 2002). Pode sofrer reações de escurecimento, como a reação de Maillard e de caramelização, durante tratamentos térmicos, com diminuição do valor nutricional (SILVA et al., 1997). A reação de Maillard envolve um grupo aldeído (açúcar redutor) e grupos amina de aminoácidos, peptídeos e proteínas, formando, inicialmente, glicosilamina e, após várias etapas, um pigmento escuro denominado melanoidina. A reação de caramelização envolve a degradação do açúcar na ausência de aminoácidos ou proteínas que, em temperaturas elevadas, são pirolisados para diversos produtos de degradação de alto peso molecular, denominados caramelo (ARAÚJO, 1999).

No leite bovino, a gordura está quase que totalmente esterificada ao glicerol, na forma de triglicerídeos. Representa a principal fonte de energia para os mamíferos recém-nascidos e carregam compostos essenciais como ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis (SCHLIMME & BUCHHEIM, 2002). Os ácidos graxos mais comuns são butírico, capríco, caprílico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico e diidroxisteárico (MACHADO et al., 2002).

O leite bovino contém vários compostos nitrogenados, dos quais 95 % ocorrem como proteínas e 5 % como nitrogênio não protéico (SILVA et al., 1997). As

proteínas do leite são a caseína, que se encontra na forma coloidal e representa 78 % do total da proteínas, as albuminas e globulinas, que se encontram em solução e são denominadas de proteínas do soro (MACHADO et al., 2002).

O leite contém teores elevados de cálcio, fósforo, potássio, sódio e magnésio e baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês (SILVA, et al., 1997).

O conteúdo médio de ferro no leite bovino é de, aproximadamente, 0,5 mg por litro (SOGLIA, 1996). No leite integral, 14 % do ferro está associado à membrana dos glóbulos de gordura 24 % ligado à caseína, 29 % às proteínas do soro e 32 % associado a moléculas não protéicas, de baixo peso molecular, como ácido cítrico e fosfato inorgânico (GAUCHERON, 2000).

## 2.8. Adição de ferro em leite

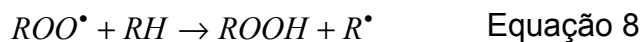
O leite é uma fonte de proteínas, cálcio e vitaminas A e D, porém pobre em ferro.

Uma limitação do enriquecimento de leite com ferro é a oxidação de gordura catalisada por este metal, que acarreta em desenvolvimento de sabor indesejado e provoca uma diminuição da vida de prateleira do produto (SOGLIA, 1996).

As modificações oxidativas na gordura láctea são provocadas, na maioria das vezes, pela oxidação de ácidos graxos insaturados, livres ou esterificados, em contato com o oxigênio. Temperaturas elevadas, luz e alguns elementos, como o ferro, atuam cataliticamente nas reações de oxidação de lipídios (SCHLIMME & BUCHHEIM, 2002).

A oxidação dá-se por meio da perda de um elétron do ácido graxo insaturado, formando um radical livre,  $R^{\bullet}$ , (Equação 6), que reage um o oxigênio ( $O_2$ ) formando um radical peroxil,  $ROO^{\bullet}$ , (Equação 7). Este radical remove hidrogênio de outro ácido graxo (Equação 8), produzindo peróxido ( $ROOH$ ) e outro radical livre (ARAÚJO, 1999).





A degradação dos peróxidos dá origem a álcoois, cetonas, ésteres e hidrocarbonetos, principais produtos da oxidação lipídica e responsáveis pelo sabor característico do alimento oxidado (MIRANDA, 1999).

A oxidação lipídica pode causar perda de qualidade nutricional, pela oxidação das vitaminas lipossolúveis e provocar diarreia e diminuição da absorção devido à irritação na mucosa, causada por alguns peróxidos (MIRANDA, 1999).

Uma outra limitação do enriquecimento de leite com ferro é a influência negativa do consumo de leite sobre a concentração de hemoglobina, demonstrada por LEVY-COSTA & MONTEIRO (2004). Segundo os autores, esta influência negativa se deve a dois mecanismos: o diluidor e o inibidor. O mecanismo diluidor refere-se à baixa concentração de ferro no leite, diminuindo o teor de ferro ingerido por calorias da dieta, entretanto, o enriquecimento do leite com este mineral minimiza este mecanismo. O mecanismo inibidor está relacionado à presença de elementos inibidores da absorção de ferro no leite, como o cálcio, caseína e proteínas do soro.

Embora ainda não se saiba com precisão os mecanismos envolvidos na interação negativa entre cálcio e ferro há indicações que o cálcio inibe a absorção de ferro quando ambos são ingeridos numa mesma refeição, sendo este efeito observado tanto para o ferro não-heme quanto para o ferro heme. A maioria dos autores sugere que esta inibição ocorra em nível celular, com alteração na absorção do ferro não-heme no nível de borda em escova. Entretanto, o fato de ter sido observada redução na absorção de ferro heme sugere que a interação também ocorra em algum estágio após a absorção pela borda em escova, como inibição na saída do enterócito ou competição pela mobilferrina (YBARRA, 2001).

O efeito antagônico observado entre cálcio e ferro em experimentos pontuais e em curto prazo não foram observados em experimentos em longo prazo. Uma das hipóteses levantadas para explicar esta diferença seria uma resposta adaptativa nas células intestinais, utilizando com maior eficiência o ferro dietético em resposta à diminuição do suprimento de ferro no plasma (YBARRA, 2001).

Apesar das evidências com relação à interação negativa entre ferro e cálcio, o leite e seus derivados tem sido fortificados por serem produtos de fácil administração e bem aceitos por crianças, faixa da população mais acometida pela deficiência de ferro (YBARRA, 2001).

Vários estudos têm demonstrado efetivo aumento no teor de ferro em crianças com o consumo de leite adicionado de ferro. Em Santiago, Chile, RIOS L. et al. (1999), compararam duas formas de administrar ferro: ferro adicionado ao leite e como suplemento alimentar na forma de sulfato ferroso líquido. Cento e trinta crianças foram divididas em dois grupos:

- Um grupo (grupo A) recebeu leite em pó fortificado com ferro e vitamina C. Uma vez preparado, cada litro continha 15 mg de ferro e 100 mg de vitamina C. Cada criança recebeu 150 mL de leite por quilo por dia, dos 3 meses aos 12 meses, o que corresponde a 2,5 mg de ferro por quilograma por dia;
- O outro grupo (grupo B), recebeu leite sem vitaminas e sulfato ferroso medicinal em uma ou duas doses diárias, equivalente a 2,5 mg de ferro por quilograma por dia, dos 3 meses aos 12 meses.

O nível de hemoglobina e saturação de transferrina não apresentaram diferença significativa aos 3 meses, porém aos 6 meses, 9 meses e 12 meses se observou uma diferença significativa em favor do grupo A. O resultado demonstra que a fortificação de alimentos é eficiente no combate à anemia e que o uso de suplemento medicamentoso pode ser prejudicado pelo fato das mães esquecerem de administrar o fármaco. Neste experimento, este fato foi constatado pelas enfermeiras em visitas domiciliares e se acentuavam com o passar do tempo (RIOS L. et al, 1999).

OSMAN & AL-OTHAIMEEN (2002) também verificaram a eficácia da fortificação de leite na redução da anemia. Foram oferecidos a 131 crianças (79 meninos e 52 meninas), com idades entre 6 anos e 14 anos, na cidade de Riyadh, Arábia Saudita, leite UHT contendo 6 mg de ferro por litro, na forma de ferro aminoácido quelato. A prevalência da anemia diminuiu de 25,3 % para 5 % entre os meninos e de 23 % para 9,6 % entre as meninas.

Em São Paulo, CINTRA et al. (2002) avaliaram o impacto da suplementação de leite fluido com ferro aminoácido quelato. O estudo foi realizado em quatro

escolas públicas, nas quais duas foram suplementadas com 200 mL de leite contendo 3 mg de ferro aminoácido quelato por dia. No grupo suplementado o nível de hemoglobina subiu de 12,02 g/dL  $\pm$  1,44 g/dL para 13,05 g/dL  $\pm$  1,29 g/dL e a porcentagem de anemia diminuiu de 30,2 % para 5 %.

Em Angatuba, SP, TORRES et al. (1996) avaliaram o impacto da suplementação de leite in natura com ferro aminoácido quelato, durante 12 meses, em 269 crianças com idade entre 6 meses e 42 meses. A cada beneficiário foi distribuído diariamente um litro de leite in natura com 3 mg de ferro aminoácido quelato. Antes da intervenção, a anemia estava presente em 62,3 % das crianças. Após seis meses de suplementação, este percentual se reduziu a 41,8 % e, ao final de um ano, para 26,4 %. O incremento médio de hemoglobina foi de 0,9 g/dL para menores de um ano, 1,5 g/dL na faixa de 12 meses a 23 meses, 1,0 g/dL dos 24 aos 35 meses e de 0,3 g/dL para os maiores de 36 meses. Encontrou-se melhores evoluções hematológicas em crianças que ingeriam quantidades superiores a 750 mL por dia de leite fortificado, pertencentes a famílias que não dividiam o suplemento recebido com outros membros.

TORRES et al. (1995) verificaram o efeito do uso de leite em pó fortificado com ferro e vitamina C em 335 crianças com idades entre seis e 23 meses em 13 creches de três municípios da Grande São Paulo e crianças captadas por demanda espontânea das Unidades Básicas de Saúde (UBS), do município de Ibiúna, SP. As crianças passaram a receber leite em pó fortificado com 9 mg de ferro e 65 mg de vitamina C por 100 g de leite em pó (após reconstituição, cada mamadeira de 250 mL oferecia 3mg de ferro e 13,6 mg de vitamina C). Antes da intervenção, 66,4 % das crianças nas creches e 72,8 % das crianças nas UBS apresentavam anêmicas (hemoglobina inferior a 11,0 g/dL). Ao final de seis meses, nas creches 20,6 % das crianças permaneciam anêmicas e nas USB 18,0 %. Nas creches, o incremento médio de hemoglobina foi de 1,9 g/dL em crianças com anemia e de 0,4 g/dL nas sem anemia. Nas UBS, o incremento foi de 1,4 g/dL para crianças anêmicas e de 0,4 g/dL para não anêmicas. TORRES et al. (1995) ressaltaram que, além de promover o aumento nos níveis de hemoglobina, a distribuição mensal de um tipo de suplemento alimentar pode ser usada como estratégia para atrair a população mais carente as UBS e com isso melhorar a atenção à saúde da criança. No estudo em questão, ao final de seis meses, somente 5,4 % das mães desistiram do suplemento.

## 2.9. Compostos de ferro

Para a fortificação de leite e produtos de laticínios, segundo GAUCHERON (2000), três categorias de compostos de ferro tem sido utilizados (Quadro 3):

- Sais de ferro em dois estados de oxidação ( $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$ ). Estes sais são solúveis em água, entretanto, interagem com compostos do leite, alterando as propriedades sensoriais. Neste grupo também se encontram agentes complexantes que se ligam ao ferro, diminuindo as alterações provocadas nos alimentos.
- Ferro elementar ou  $\text{Fe}^0$ , obtido pela redução com  $\text{H}_2$  ou  $\text{CO}$ , por eletrólise ou por formação de carbonil. Estes compostos são quimicamente inertes, de vários tamanhos, pouco solúveis ou insolúveis em água. Tem a desvantagem de só serem adicionados a alimentos sólidos desidratados por não serem solúveis em líquidos neutros.
- Ferro complexado com proteínas ou fosfolipídios. Os sítios de ligação com o ferro são principalmente aminoácidos como fosfoserina, glutamato e aspartato. Geralmente não reagem com componentes dos alimentos.

O sulfato ferroso é a substância mais utilizada para tratamento da anemia devido ao baixo custo e elevada biodisponibilidade. Apresenta cor esverdeada, sabor metálico e odor irritante. Em doses elevadas pode causar problemas de intoxicação (SAKAMOTO, 2003).

Os compostos quelatos de ferro, como o ferro aminoácido quelato (biglicinato de ferro),  $\text{NaFeEDTA}$ , ferro maltose e ferroprotinato, apresentam a mesma biodisponibilidade do sulfato ferroso, porém menores alterações no alimento. Os quelatos devem se ligar ao ferro de forma a permitir sua transferência para outros ligantes presentes na membrana ou citosol do enterócito, porém, devem evitar a liberação do ferro em sítios onde este possa agir formando radicais livres (SAKAMOTO, 2003) e a solubilidade destes quelato deve ser alta nas proximidades dos sítios de absorção (CLAUD & FREITAS, 1994).

O ferro aminoácido quelato é um composto de ferro ligado a duas moléculas de glicina, resultando em um duplo anel heterocíclico. O grupo  $\alpha$ -carboxílico da

glicina é ligado ao ferro por uma ligação iônica, enquanto que o grupo  $\alpha$ -amino é ligado ao metal por uma ligação covalente (OLIVARES et al., 1997).

QUADRO 3: Alguns compostos de ferro utilizados na fortificação de produtos lácteos.

Sais ferrosos	Sais férricos	Ferro elementar	Ferro ligado a proteínas
Sulfato	Sulfato	Ferro carbonil	Lactoferrina
Cloreto	Cloreto	Ferro eletrolítico	Ferro-proteína do soro
Gluconato	Citrato		Ferro-caseinato
Amônio sulfato	EDTA		Ferro-proteína succinilato
Fumarato	Ortofosfato		Ferro-fosfopeptídeo
Carbonato	Pirofosfato		
Lactato	Nitriloacetato		
Sacarato	Lactobionato		
	Amônio citrato		
	Amônio sulfato		
	Colina citrato		
	Glicerofosfato		
	Glicinato		
	Frutose		
	Citrato fosfato		
	Gliconato		
	Polifosfato		

Fonte: GAUCHERON (2000)

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O preparo das amostras, as análises físico-químicas dos produtos e o teste de biodisponibilidade *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Análise de Alimentos e no Laboratório de Pesquisa de Leite e Derivados no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais.

#### 3.1. Preparo das amostras

Duas fontes de ferro foram adicionadas ao leite: ferro aminoácido quelato (Albion Laboratories, Inc. Clearfield-Utah-USA) e sulfato ferroso heptahidratado,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , (Vetec Com. & Repr. Rio de Janeiro-BR), ambos contendo 20 % de ferro. Para facilitar os processos de pesagem e mistura, foi preparada uma pré-mistura da fonte de ferro em leite em pó, na proporção de uma parte da fonte de ferro para 20 partes de pré-mistura. Assim, cada grama de pré-mistura elaborada contém 0,01 g de ferro.

As duas fontes de ferro foram adicionadas ao leite antes e após a secagem. O leite em pó sem adição de ferro foi tomado como referência, totalizando cinco tratamentos. Todos os tratamentos foram preparados em três repetições.

Para os tratamentos nos quais o ferro foi adicionado após a secagem (Figura 2), foi adicionado ao leite em pó comercial 12 mg de ferro para 100 g de amostra, de forma que, após reconstituição, na proporção de 26 g (duas colheres de sopa) de leite em pó para 200 mL de água (1 copo), cada 100 mL do produto pronto para

consumo forneça 1,5 mg de ferro, equivalente a 15 % da IDR de referência para crianças. Desta forma, de acordo com a Portaria nº 31 de 13 de janeiro de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o produto pode ser considerado enriquecido ou fortificado (BRASIL, 1998).

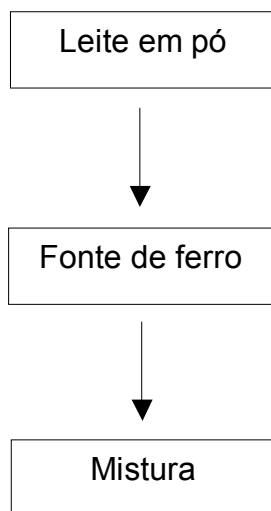


FIGURA 2: Fluxograma para os tratamentos nos quais a fonte de ferro foi adicionada após a secagem do leite.

Para os tratamentos nos quais o ferro foi adicionado antes da secagem (Figura 3), foi adicionado ao leite tipo C já pasteurizado, proveniente do Laticínio–Escola da FUNARBE/UFV, 1,5 mg de ferro para 100 mL de leite. As amostras foram concentradas até redução de 50 % do volume e desidratadas em Spray-dryer (Mini spray-dryer, Büchi Switzerland, B-191), com temperatura de entrada do ar em torno de  $180\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e temperatura de saída em torno de  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Todas as amostras foram armazenadas em recipientes de plástico (polipropileno) revestido com papel alumínio e mantidas ao abrigo da luz.

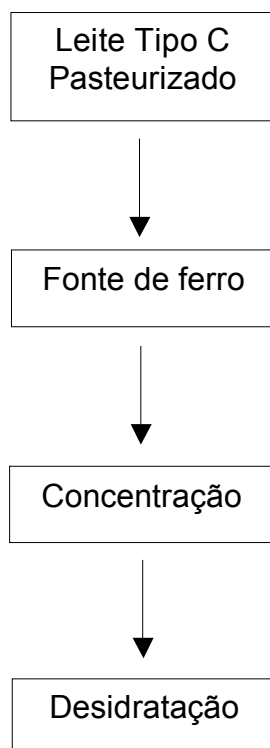


FIGURA 3: Fluxograma para os tratamentos nos quais a fonte de ferro foi adicionada antes da secagem do leite.

A Tabela 1 mostra um resumo dos tratamentos aplicados, com as fontes de ferro e a forma de secagem para cada tratamento.

Tabela 1: Resumo dos tratamentos aplicados

Tratamentos	Fonte de ferro	Forma de secagem
A (Controle)		
B	$\text{FeSO}_4$	Após a adição da fonte de ferro
C	$\text{FeSO}_4$	Antes da adição da fonte de ferro
D	Ferro aminoácido quelato	Após a adição da fonte de ferro
E	Ferro aminoácido quelato	Antes da adição da fonte de ferro

## **3.2. Análises físico-químicas**

Foram realizadas as seguintes análises:

### **3.2.1. Prova de reconstituição**

A reconstituição do produto foi feita diluindo 1 g do leite em pó em 7 g de água conforme descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

### **3.2.2. Acidez em ácido láctico**

A acidez titulável do leite em pó, expressa em ácido láctico, foi determinada conforme descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), titulando-se 1 g de amostra diluída em 7 g de água com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

### **3.2.3. Umidade**

O teor de umidade foi determinado através de secagem em estufa a 95 °C até peso constante, conforme descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

### **3.2.4. Teor de lipídios**

O teor de lipídios foi analisado com o uso do butirômetro de Teichert, conforme descrito por SILVA et al. (1997). O método baseia-se na separação e quantificação da gordura por meio do tratamento de 2,5 g de amostra, após completa dissolução em 10 mL de água, com 10 mL de ácido sulfúrico e 1 mL de álcool isoamílico. O ácido dissolve as proteínas que envolvem os glóbulos de gordura, liberando-a. A liberação de calor funde a gordura o que favorece sua separação pelo extrator (álcool isoamílico). A leitura é feita diretamente na escala graduada do butirômetro após centrifugação e imersão em banho-maria.

### 3.2.5. Teor de proteínas

A determinação do teor de proteínas foi baseada na determinação de nitrogênio total, empregando-se o método de Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Para conversão dos teores de nitrogênio total para percentual de proteínas, utilizou-se o fator 6,38, considerando-se a caseína como proteína predominante e o teor de nitrogênio na caseína de 15,68 % (GOMES et al., 2003).

### 3.2.6. Teor de lactose

A determinação do teor de lactose foi realizada utilizando-se cloramina T, conforme descrito por GOMES et al. (2003). Este método tem como princípio a oxidação de açúcares redutores por hipiodito liberado durante a reação de cloramina T e iodeto de potássio.

Três gramas de leite em pó foram reconstituídos, utilizando-se 21 g de água destilada e transferido para um balão de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de sulfato de zinco a 15 % e 5 mL de NaOH 0,75 N e completou-se o volume do balão com água destilada. Deixou-se em repouso por 10 minutos e filtrou-se. Transferiu-se 5 mL do filtrado para um erlenmeyer, adicionou-se 20 mL de água destilada, 20 mL de iodeto de potássio a 10 % e 50 mL de solução de cloramina T 0,7 %. Deixou-se em repouso por 90 minutos. Adicionou-se 10 mL de ácido clorídrico 2 N e titulou-se com tiosulfato de sódio 0,1 N, utilizando solução de amido a 1 % como indicador. Foi realizada a titulação de um branco utilizando-se somente água destilada.

### 3.2.7. Teor de Cinzas (Resíduo mineral fixo)

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 °C, conforme descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

### 3.2.8. Sedimentos

Baseia-se na determinação da quantidade de sedimentos retidos num papel de filtro. O total de sedimentos foi determinado por reconstituição e filtragem conforme descrito por SILVA et al. (1997). O leite em pó foi reconstituído na proporção de 1 g de leite em pó para 7 g de água, filtrado e o material retido no filtro foi pesado após secagem em estufa a 95 °C.

### 3.2.9. Teor de ferro

As concentrações de ferro no leite em pó foram determinadas após mineralização de 1 g de amostra por via úmida, utilizando-se mistura digestora nitro-perclórica na proporção de 3:1. Aqueceu-se em chapa, até fervura branda, mantendo-se esta condição até a formação de uma solução límpida. As amostras foram transferidas para balões de 100 mL, o volume foi completado com água destilada e as amostras foram armazenadas em recipientes de plástico com tampa rosqueável.

O teor de ferro foi determinado por leitura colorimétrica no comprimento de onda de 510 nm do complexo colorido formado por complexação do íon  $Fe^{+2}$  com ortofenantrolina, conforme descrito por GOMES et al. (2003). Retirou-se uma alíquota de 2 mL das amostras mineralizadas e adicionou-se 2 mL de tampão ácido acético/acetato de amônio, 2 mL de cloreto de hidroxialamina a 10 % e 1 mL de solução 0,5 % de ortofenantrolina. Deixou-se em repouso por 20 minutos e procedeu-se a leitura no comprimento de onda de 510 nm em espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV mini 1240. A determinação de ferro foi realizada utilizando uma curva padrão previamente estabelecida.

### 3.2.10. Efeito na oxidação de gordura

A análise dos produtos secundários de oxidação de gordura foi realizada pelo índice de TBA (ácido tiobarbitúrico), conforme descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). 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 no comprimento de onda de 530 nm, e os resultados expressos em absorbância.

As amostras foram dissolvidas em clorofórmio, na proporção de 5 g para 100 mL. Foram retirados 5 mL desta solução e colocados em um tubo de centrifuga com 5 mL de ácido tricloroacético a 10 %. A mistura foi centrifugada (International Centrifuge, modelo K, International equipment Co.) a 5000 x g por vinte minutos. Foram retirados 3 mL do sobrenadante, adicionado 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico 0,75 % e colocado em água fervente por 10 minutos. Resfriou-se e então se procedeu a leitura no comprimento de onda de 530 nm em espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV mini 1240, usando-se água destilada como referência.

### 3.3. Biodisponibilidade *in vitro*

A biodisponibilidade *in vitro* do ferro no leite em pó foi estimada pelo método descrito por RAO & PRABHAVATHI (1978). As amostras foram incubadas a 37 °C por 90 minutos em uma solução de pepsina-HCl (0,5 % de pepsina em HCl 0,1 N), pH 1,35. Após a incubação, o pH foi ajustado para 7,5 com NaOH e as amostras foram centrifugadas (International Centrifuge, modelo K, International equipment Co.) a 5000 x g por 30 minutos. As amostras foram filtradas. O teor de ferro ionizado do filtrado foi determinado por reação colorimétrica com ortofenantrolina conforme descrito por GOMES et al. (2003).

A percentagem de ferro ionizável a pH 7,5, ou ferro biodisponível, foi calculado em relação aos teores de ferro determinados experimentalmente para as amostras.

Após determinada a biodisponibilidade *in vitro*, a biodisponibilidade *in vivo* foi deduzida a partir da equação de RAO & PRABHAVATHI (1978), equação 9.

$$V = 0,4717T + 0,4501 \quad \text{Equação 9}$$

Na qual: V = Biodisponibilidade *in vivo*;

T = Biodisponibilidade *in vitro*.

### **3.4. Análises estatísticas**

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância, com teste F. O teste T foi realizado para as amostras que obtiveram significância no teste F ao nível 1 %.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Preparo das amostras**

Durante a preparação das amostras que foram secas após a adição da fonte de ferro, o sulfato ferroso apresentou, em análise visual, melhor solubilidade que o ferro aminoácido quelato. A solubilização completa dos compostos ocorreu após aquecimento, durante a etapa de concentração, e o sulfato ferroso dissolveu primeiramente que o ferro aminoácido quelato. A solubilização pôde ser observada pelo desaparecimento de pontos coloridos, uma vez que ambos compostos apresentam cores características (sulfato ferroso apresenta coloração azul esverdeada e o ferro aminoácido quelato apresenta coloração vermelho amarronzada).

Para as amostras nas quais os compostos de ferro foram adicionados após a secagem, procedeu-se a mistura até completa homogeneização, não sendo observada, visualmente, diferenças entre as duas fontes de ferro.

A adição da fonte de ferro, tanto antes quanto após a secagem, mostrou-se simples e de fácil execução, possíveis de serem instalados na indústria de leite em pó. Para adição do composto de ferro após a secagem, é necessário acrescentar uma etapa de mistura após a secagem.

## 4.2. Análises físico-químicas

### 4.2.1. Prova de reconstituição

Para todos os tratamentos, observou-se que o leite manteve-se estável, durante quatro horas, sem precipitações. Considerando que o consumo do leite é feito logo após a reconstituição, este tempo de estabilidade garante um produto de qualidade para o consumidor.

Observou-se que os tratamentos nos quais o ferro foi adicionado ao leite após a secagem apresentaram uma melhor dissolução. Para os tratamentos nos quais a adição de ferro foi feita antes da secagem do leite não ocorreram dissolução completa das amostras a temperatura ambiente, sendo necessário aquecimento. Assim, todas as amostras foram aquecidas em chapa até 55 °C.

Esta diferença na dissolução das amostras se deve ao fato do leite em pó obtido comercialmente sofrer um processo de instantaneização.

O processo de instantaneização consiste num processo de aglomeração das partículas logo após a saída do secador, com o objetivo de serem dissolvidos rapidamente, sem a presença de grumos. Para o preparo de um alimento instantâneo, vários procedimentos são empregados, como o uso de emulsificantes, dispersantes e modificação da estrutura da partícula (EVANGELISTA, 1998).

Como modificação da estrutura da partícula é utilizado o processo de aglomeração, no qual pequenas partículas se unem formando um aglomerado com características próprias que facilitam a dispersão dos produtos em pó. Para obtenção destes aglomerados, é aumentada a quantidade de ar existente entre as partículas, que será posteriormente substituído pela água (EVANGELISTA, 1998).

### 4.2.2. Acidez em ácido láctico

A acidez titulável do leite varia de acordo com teores de sais minerais e proteínas. O leite, ao sair do úbere, é ligeiramente ácido, resultado da contribuição natural de seus componentes, destacando-se proteínas, fosfatos, citratos e CO<sub>2</sub>. Esta acidez original, denominada acidez titulável inicial ou natural, varia de 15° Dornic a 20° Dornic, ou 0,15 g a 0,20 g de ácido láctico por 100 mL de leite. O

aumento da acidez até o consumo do leite denomina-se acidez titulável adquirida e é proveniente da fermentação da lactose, formando ácidos, sendo o ácido láctico o mais importante (GOMES et al., 2003).

Os valores médios obtidos para acidez dos tratamentos estão mostrados na Tabela 2. Os resultados encontrados expressam a acidez dos tratamentos em percentagem de ácido láctico em peso, na diluição de 1:7 (1 g de amostra para 7 g de água).

TABELA 2: Acidez expressa em % de ácido láctico em peso, na diluição de 1:7 (1 g de amostra para 7 g de água).

Tratamentos	% em peso de Ácido Láctico
A	0,151 <sup>a</sup> ± 0,006
B	0,155 <sup>a</sup> ± 0,012
C	0,159 <sup>a</sup> ± 0,007
D	0,163 <sup>a</sup> ± 0,007
E	0,151 <sup>a</sup> ± 0,006

Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a  $p > 0,01$ .

Os resultados mostraram que a adição de sulfato ferroso e do ferro aminoácido quelato não promoveu variação significativa ( $p > 0,01$ ) na acidez expressa em ácido láctico.

Utilizando dosagens de 6 mg, 12 mg, 18 mg e 24 mg de ferro por litro em leite tipo C, sendo as fontes de ferro sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato, SOGLIA (1996) não encontrou variação significativa na acidez Dornic. Avaliou, ainda, a acidez Dornic em função do tempo de estocagem, e verificou também que não houve efeito significativo provocado pela presença de sulfato ferroso ou ferro aminoácido quelato.

#### 4.2.3. Teores de umidade, lipídios, proteínas, lactose e cinzas.

Os resultados dos teores de umidade, lipídios, proteínas, lactose e cinzas das amostras de leite em pó enriquecido com ferro podem ser observados na Tabela 3. Os valores estão expressos em percentagem em peso.

TABELA 3: Valores médios dos teores de umidade, lipídios, proteínas, lactose e cinzas.

Trat.	Umidade (%)	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Lactose (%)	Cinzas (%)
A	4,97 <sup>a</sup> ± 0,09	26,67 <sup>a</sup> ± 0,29	25,27 <sup>a</sup> ± 0,30	38,89 <sup>a</sup> ± 1,91	5,81 <sup>a</sup> ± 0,06
B	1,25 <sup>b</sup> ± 0,12	26,33 <sup>a</sup> ± 0,29	26,72 <sup>a</sup> ± 1,09	42,53 <sup>a</sup> ± 0,95	6,03 <sup>a</sup> ± 0,02
C	4,92 <sup>a</sup> ± 0,08	26,17 <sup>a</sup> ± 0,29	25,51 <sup>a</sup> ± 0,33	39,44 <sup>a</sup> ± 2,80	5,86 <sup>a</sup> ± 0,04
D	1,13 <sup>b</sup> ± 0,06	27,00 <sup>a</sup> ± 0,50	26,22 <sup>a</sup> ± 1,00	42,16 <sup>a</sup> ± 0,32	5,78 <sup>a</sup> ± 0,15
E	4,98 <sup>a</sup> ± 0,08	27,33 <sup>a</sup> ± 0,29	25,58 <sup>a</sup> ± 0,50	39,44 <sup>a</sup> ± 2,52	5,62 <sup>a</sup> ± 0,29

Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a  $p > 0,01$ .

Para os teores de umidade, expressos em base úmida, houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os valores de umidade dos tratamentos que utilizaram leite em pó comercial, adicionado ou não de ferro, e aos tratamentos nos quais o ferro foi adicionado antes da secagem.

A diferença do teor de umidade entre os tratamentos nos quais o ferro foi adicionado após a secagem bem como no controle e os tratamentos nos quais a adição de ferro foi feita antes da secagem do leite, feita em laboratório, se deve a diferenças no processo de secagem das amostras.

No entanto, de acordo com a Portaria nº 369 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), o teor máximo de umidade permitido para o leite em pó integral é de 3,5 % e as amostras de leite em pó comerciais, adicionadas ou não de ferro, estavam com umidade acima da permitida.

Os tratamentos não diferiram quanto ao teor de lipídios ( $p > 0,01$ ) e, de acordo com a Portaria nº 369 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), são classificadas como leite em pó integral, pois possuem um teor de lipídios totais superior a 26 % em peso, mínimo estabelecido pela legislação.

Não houve diferença significativa ( $p > 0,01$ ) para os cinco tratamentos em relação ao teor de proteínas. O teor de proteínas encontrado equivale aos valores encontrados por SOGLIA (1996) e se equivalem aos valores encontrados em formulações comerciais.

Também não houve diferença significativa ( $p > 0,01$ ) nos teores de lactose entre os tratamentos.

Apesar de ser adicionado um composto mineral, a adição de sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato não provocou aumento significativo ( $p > 0,01$ ) nos teores de

cinzas, pois a quantidade de ferro adicionada necessária à fortificação é pequena em relação ao resíduo mineral fixo total.

#### 4.2.4. Sedimentos

Os teores de sedimentos encontrados para as amostras estão demonstrados na Tabela 4. Os valores estão expressos em percentagem em peso.

TABELA 4: Sedimentos retidos em papel de filtro após reconstituição.

Tratamentos	Sedimentos (% em peso)
A	1,42 <sup>a,b</sup> ± 0,03
B	1,24 <sup>b</sup> ± 0,01
C	1,35 <sup>a,b</sup> ± 0,03
D	1,58 <sup>a</sup> ± 0,01
E	1,43 <sup>a,b</sup> ± 0,12

Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a  $p > 0,01$ .

Todas as amostras adicionadas de ferro não diferiram significativamente ( $p > 0,01$ ) da amostra controle sem adição de ferro. As fontes de ferro utilizadas não interferiram no teor de sedimentos do leite em pó após reconstituição.

Para as amostras nas quais as fontes de ferro foram adicionadas antes da secagem, o sulfato ferroso apresentou um menor teor de sedimentos após reconstituição, devido à maior solubilidade deste durante a adição, mas não há diferença significativa ( $p > 0,01$ ) entre a forma de adição para uma mesma fonte de ferro.

#### 4.2.5. Teor de ferro

A Tabela 5 mostra o teor de ferro médio para os cinco tratamentos. Para todos os tratamentos nos quais foi adicionado ferro, o teor de ferro determinado foi superior a 15 % da IDR para 100 mL de produto pronto para consumo, preparado na proporção de 26 g de leite em pó para 200 mL de leite reconstituído. Neste caso, de acordo com a Portaria nº 31 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1998), o leite em pó pode ser considerado enriquecido ou fortificado com ferro.

TABELA 5: Teor de ferro determinado por espectrofotometria após reação com ortofenantrolina.

Tratamentos	Teor de ferro determinado (mg/g)	% IDR de ferro por 100 mL de produto pronto para consumo
A	0,026 <sup>a</sup> ± 0,009	3,25
B	0,147 <sup>b</sup> ± 0,006	18,33
C	0,143 <sup>b</sup> ± 0,004	17,83
D	0,126 <sup>b</sup> ± 0,005	15,71
E	0,124 <sup>b</sup> ± 0,005	15,46

Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a  $p > 0,01$ .

Entretanto, o teor de ferro determinado para o leite em pó sem adição deste mineral é superior ao teor encontrado por SOGLIA (1996), que foi de 1,1 mg/kg de leite (0,0011 mg/g). Também foi superior ao citado por SCHLIMME & BUCHHEIM (2002), que é de 0,3 mg de ferro por litro de leite ou, considerando que 26 g de leite em pó serão reconstituídos formando 200 mL de leite, 0,0024 mg de ferro por grama de leite em pó. Este teor elevado de ferro determinado pelo método colorimétrico pode estar relacionado a erros de medida da metodologia, pois a concentração de ferro no leite é muito inferior ao primeiro ponto utilizado na curva padrão.

#### 4.2.6. Efeito na oxidação de gordura

A estabilidade oxidativa do leite em pó, expressa pelo índice de TBA, foi influenciada pela adição das fontes de ferro (Tabela 6), sendo a estabilidade oxidativa do aminoácido quelato superior à do sulfato ferroso. Em relação à forma de adição de ferro, antes ou após a secagem do leite, para uma mesma fonte de ferro, não houve diferença significativa ( $p > 0,01$ ).

Estes resultados estão coerentes com os encontrados por MIRANDA (1999) que avaliou o efeito do enriquecimento de ferro em alimento a base de leite em pó e fubá de milho. A oxidação lipídica observada foi maior quando adicionado sulfato ferroso quando comparado ao ferro aminoácido quelato, com valores médios de absorbância a 532 nm de 1,356 para o sulfato ferroso e 0,838 para o ferro aminoácido quelato.

TABELA 6: Estabilidade oxidativa expressa pelo índice de TBA, com absorvância medida a 530 nm.

Tratamentos	Absorvância a 530nm
A	0,120 <sup>a</sup> ± 0,015
B	0,264 <sup>b</sup> ± 0,009
C	0,251 <sup>b</sup> ± 0,004
D	0,189 <sup>c</sup> ± 0,013
E	0,192 <sup>c</sup> ± 0,008

Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a  $p > 0,01$ .

Segundo GAUCHERON (2000), sais de ferro produzem grande oxidação de lipídios e os quelatos de ferro uma oxidação menor. Isto pode ser explicado pela menor reatividade do íon ferro na molécula do ferro aminoácido quelato. O íon permanece ligado às duas moléculas de glicina, não estando disponível para catalisar as reações de oxidação lipídica.

A oxidação lipídica causa alterações sensoriais no alimento devido ao desenvolvimento do sabor de ranço e a medida da oxidação lipídica pelo teste de TBA tem sido correlacionada positivamente com a presença de sabores indesejáveis no alimento (GAUCHERON, 2000).

Esta correlação positiva pôde ser observada por MIRANDA (1999), que observou diferença na aceitação de um alimento à base de leite em pó e fubá enriquecido com ferro aminoácido quelato e com sulfato ferroso, assim como entre os níveis de ferro utilizados no enriquecimento. A avaliação sensorial foi realizada por crianças por meio de teste de aceitação, utilizando-se escala hedônica gráfica de nove pontos. A média obtida para o alimento enriquecido com aminoácido quelato foi de 6,94, situando-se próximo ao termo hedônico “gostei moderadamente” e para o enriquecido com sulfato ferroso foi de 6,05, situando-se próximo ao termo hedônico “gostei ligeiramente”. O controle, alimento sem a adição de ferro, obteve nota média de 7,69, situando-se mais próximo ao termo hedônico “gostei muito”.

SOGLIA (1996) ao verificar a estabilidade oxidativa, expressa pelo índice de TBA, do leite pasteurizado, observou influência da adição das fontes de ferro (ferro aminoácido quelato e sulfato ferroso), porém não ocorrendo diferença significativa entre as fontes. Foi observado diferença significativa entre as dosagens de ferro utilizadas. Entretanto, na avaliação sensorial, que foi realizada por um painel de seis provadores treinados, utilizando-se um método descritivo, verificou-se diferença

significativa entre as fontes de ferro, porém o efeito dos diferentes níveis de adição de ferro não foi significativo. Na avaliação sensorial realizada, as amostras foram avaliadas para sabor oxidado, com uso de uma escala estruturada que avaliava a percepção do sabor metálico (oxidado) e variava de “imperceptível” a “muito pronunciado”. A média geral atribuída ao leite enriquecido com ferro aminoácido quelato foi semelhante ao leite sem adição de ferro, obtendo-se classificação de “moderadamente perceptível”. Para o sulfato ferroso, a média geral foi considerada “perceptível”.

Outros estudos utilizando ferro aminoácido quelato demonstram que este fortificante provoca poucas mudanças nas características sensoriais do produto, não afetando a aceitabilidade dos mesmos (TUMA et al., 2003; OSMAN & AL-OTHAIMEEN, 2002).

Além da deterioração da qualidade sensorial e nutricional provocada pela oxidação lipídica, os radicais livres formados durante o processo de oxidação têm sido relacionados à presença de risco de infarto do miocárdio e câncer. Portanto, o aumento da oxidação lipídica é indesejável em qualquer alimento.

#### **4.3. Biodisponibilidade *in vitro***

A eficácia de uma suplementação ou fortificação com ferro pode ser predita por estudos de biodisponibilidade (OLIVARES et al., 1997).

A determinação de ferro ionizado a pH 7,5 tem sido útil para prever a biodisponibilidade de ferro em humanos. Assume-se que, em pH estomacal de 1,35, a maior parte do ferro encontra-se numa forma ionizável e solúvel. Quando o pH é aumentado para o pH duodenal de 7,5, a maior parte do ferro torna-se insolúvel, permanecendo em solução a parte do ferro ionizável e o ferro ligado a componentes da dieta que elevam a absorção férrea (NAYAK & NAIR, 2003).

RAO & PRABHAVATHI (1978), em estudos *in vitro*, observaram que a presença de ácido ascórbico e extrato de carne aumentam o teor de ferro ionizável a pH 7,5, enquanto que a presença de fitatos e taninos diminui, semelhante aos efeitos destes fatores em absorção férrea em humanos.

Os resultados observados para a biodisponibilidade de ferro *in vitro*, medido a pH 7,5, mostram uma maior biodisponibilidade do ferro aminoácido quelato ( $p < 0,01$ ) em relação ao sulfato ferroso (Tabela 7). A média da biodisponibilidade *in vitro* obtida para o ferro aminoácido quelato foi de 31,81 % e para o sulfato ferroso foi de 17,41 %.

TABELA 7: Biodisponibilidade de ferro *in vitro* e biodisponibilidade *in vivo*, deduzida a partir da equação de RAO & PRABHAVATHI

Tratamentos	Biodisponibilidade (%) <i>in vitro</i>	Biodisponibilidade (%) <i>in vivo</i> , deduzida
A	14,79 <sup>a</sup> ± 3,33	7,42
B	17,76 <sup>a</sup> ± 5,54	8,83
C	17,07 <sup>a</sup> ± 5,87	8,50
D	31,91 <sup>b</sup> ± 7,72	15,50
E	31,70 <sup>b</sup> ± 7,11	15,40

Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a  $p > 0,01$ .

Utilizando a equação de RAO & PRABHAVATHI (1978) é possível prever a biodisponibilidade *in vivo*. A Tabela 7 mostra a biodisponibilidade de ferro *in vivo* para os diferentes tratamentos. A média da biodisponibilidade *in vivo* encontrada pela equação de RAO & PRABHAVATHI (1978) para o ferro aminoácido quelato foi de 15,45 % e para o sulfato ferroso foi de 8,66 %.

Não houve diferença significativa ( $p > 0,01$ ) entre a biodisponibilidade *in vivo* deduzida do sulfato ferroso adicionado ao leite e do ferro naturalmente presente no leite. O valor encontrado para a biodisponibilidade do ferro no leite, sem fortificação, foi de 7,42 %, valor inferior a 10 %, citado por CARDOSO E PENTEADO (1994).

Os resultados encontrados para a absorção do sulfato ferroso são superiores aos encontrados por STEKEL et al. (1986) e semelhantes ao encontrado por NAYAK & NAIR (2003). STEKEL et al. (1986) encontraram uma absorção variando de 2,9 % a 5,1 % para o sulfato ferroso, utilizando estudos de mono-isótopo e duplo-isótopos, em leite bovino, com concentrações variando de 10 mg a 19 mg de ferro por litro. A biodisponibilidade do sulfato ferroso adicionado à farinha de trigo encontrada por NAYAK & NAIR (2003), pelo método *in vitro* descrito por RAO & PRABHAVATHI (1978), foi de 7,71 %.

Os resultados encontrados para a biodisponibilidade do ferro aminoácido quelato são consistente com os valores encontrados por OLIVARES et al. (1997) que avaliaram a biodisponibilidade deste composto adicionado ao leite e verificaram uma absorção de 11,1%.

Uma maior biodisponibilidade do ferro aminoácido quelato também foi encontrada por PINEDA et al. (1994), que avaliaram os efeitos do ferro aminoácido quelato em comparação com o sulfato ferroso na recuperação de anemia em adolescentes e por CORNBLOTH SZARFAC et al. (2001) em estudo com gestantes.

Entretanto estes resultados discordam daqueles obtidos por SOGLIA (1996) que avaliou o ganho de hemoglobina em ratos, após um período de depleção, utilizando leite tipo C enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato. O ganho de hemoglobina não diferiu significativamente entre as fontes de ferro utilizadas, quando comparados em cada nível de adição. MIRANDA (1999) encontrou resultados semelhantes aos de SOGLIA (1996) para um alimento a base de leite em pó e fubá de milho enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato.

Tanto o sulfato ferroso quanto o ferro aminoácido quelato tem sido eficientes no combate ou prevenção da deficiência de ferro.

Usando a absorção obtida no presente estudo e assumindo o consumo diário de 750 mL de leite (OLIVARES et al., 1997) fortificado com 15 mg/L, a quantidade de ferro absorvido será de 1,74 mg de ferro diariamente para o ferro aminoácido quelato e de 0,97 mg de ferro para o sulfato ferroso. Esta quantidade de ferro absorvido supera as necessidades diárias de ferro do organismo para crianças, que foram estabelecidas em 1 mg por dia (NRC, 1989). Baseado nestes valores, uma quantidade menor de ferro poderia ser adicionada ao leite. Neste caso, o leite não seria mais considerado pela legislação como fortificado e sim como fonte deste mineral, se o leite contiver no mínimo 0,75 mg de ferro por 100 mL de leite reconstituído (BRASIL, 1998). Uma menor quantidade de ferro adicionada ao leite diminui os problemas relacionados à oxidação de lipídios e tem sido eficiente na recuperação de crianças anêmicas (OSMAN & AL-OTHAIMEEN, 2002; TORRES, 1996).

## 5. CONCLUSÕES

Foram enriquecidas amostras de leite em pó e leite fluido seguido de secagem com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato. Os resultados encontrados indicam as seguintes conclusões:

- O enriquecimento do leite em pó com as duas fontes de ferro utilizadas foi obtido com sucesso. Ambos os processos tecnológicos mostraram-se simples e de fácil execução em laboratório.
- A forma de enriquecimento, antes ou após a secagem do leite, não interferiu nas características físico-químicas, estabilidade lipídica ou biodisponibilidade do ferro *in vitro*.
- As fontes de ferro não afetaram as características físico-químicas de acidez, umidade, teores de lipídios, proteínas, lactose, cinzas e sedimentos retidos em papel de filtro após reconstituição.
- A estabilidade oxidativa, ou estabilidade lipídica, do leite enriquecido com ferro aminoácido quelato foi maior que a do sulfato ferroso, porém menor que a do controle. Desta forma, o ferro aminoácido quelato provoca menores alterações oxidativas no alimento, conservando suas características sensoriais por um período maior de tempo.
- A biodisponibilidade *in vitro* do ferro aminoácido quelato foi maior que a do sulfato ferroso.

Entretanto, alguns estudos ainda devem ser conduzidos no intuito de determinar qual a melhor formulação e a melhor forma de enriquecer o leite em pó como:

- Desenvolver um leite em pó com um menor teor de ferro (fonte de ferro) e caracterizar o produto, determinando a estabilidade oxidativa;
- Determinar a biodisponibilidade *in vivo* do leite em pó com ferro;
- Realizar uma análise sensorial do leite em pó adicionado de ferro;
- Estudar a viabilidade do enriquecimento de leite em pó em escala piloto e escala industrial.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2ª ed. Viçosa, UFV, 1999, 416p.

BARBOSA, T.N.N., CARDOSO, A.L. Deficiência de ferro e repercussões sobre o desenvolvimento cognitivo: aspectos preventivos. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, vol.18, n.3, p.130-135, jul./set. 2003.

BEARD, J., PIÑERO, D. Deficiencia de hierro y desarrollo neural: metabolismo del hierro en el cerebro. **Dieta e salud**, ano 5, n. 3, 1998, disponível em <<http://www.kelloggs-nutricion.com>>, acessado em 08 abr. 2004.

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

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações; produção, industrialização, análise**. São Paulo, Nobel, 1995, 320 p.

BOVELL-BENJAMIN, A., GUINARD, J.X. Novel approaches and application of contemporary sensory evaluation practices in iron fortification programs. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol.43, n.4, p.379-400, 2003.

BOVELL-BENJAMIN, A., VITERI, F.E., ALLEN, L.H. Iron absorption from ferrous bisglycinate and trisglycinate in whole maize is regulated by iron status. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol.71, p.1563-1569, 2000.

BRASIL. Resolução - RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002. Regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>, acessado em 08 abr. 2004.

BRASIL. Portaria nº 31 de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>, acessado em 08 abr. 2004.

BRASIL. Portaria nº 369 de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite em pó. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>, acessado em 25 out. 2004.

BRASIL. **Ministério da Saúde**, disponível em <<http://www.saude.gov.br>>, acessado em 16 maio 2004.

BRIGIDE, P. Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiados. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2002. (Tese de mestrado)

BUONGERMINO SOUZA, S., CORNBLUTH SZARFAC, S. PACHECO SOUZA, J.M. Anemia no primeiro ano de vida em relação ao aleitamento materno. **Revista Saúde Pública**, vol. 31, n.1, p.15-20, fev. 1997.

CARDOSO, M.A., FERREIRA, M.U., CAMARGO, L.M.A., SZARFARC, S.C. Anemia em população de área endêmica de malária, Rondônia (Brasil). **Revista Saúde Pública**, vol. 26, n.3, p.161-166, jun. 1992.

CARDOSO, M.A., PENTEADO, M.V.C. Intervenções nutricionais na anemia ferropriva. **Caderno de Saúde Pública**, vol. 10, n.2, p.231-240, abr./jun. 1994.

CINTRA, I.P., OLIVEIRA, C.L., VELLOZO, E.P., FAGIOLI, D., SILVA, R., AIRES, A.P., FISBERG, M. Utilização de leite fortificado com ferro na merenda escolar do município de São Paulo. **Pediatria Moderna**, vol. 38, n.10, p.475-479, out. 2002.

CLAUD, M.V., FREITAS, O. Compostos alternativos para o tratamento e/ou prevenção da anemia ferropriva. **Caderno de Nutrição**, vol.8, p.1-9, 1994.

CORNBLUTH SZARFAC S., CASSANA, L.M.N., FUJIMORI, E., GUERRA-SHINOHARA, E.M., OLIVEIRA, M.V. Relative effectiveness of iron bis-glycinate chelate (Ferrochel) and ferrous sulfate in the control of iron deficiency in pregnant women. **ALAN – Archivos Latinoamericanos de nutricion**, vol.51, n.1, supl.1. , p.42-47, mar.2001.

DIAZ A., M.S., GUERRA H., P., CAMPOS S., M.S., LETELIER C., M.A., OLIVARES G., M. Prevalencia de deficiencia de hierro en preescolares de la comuna La Pintana. **Revista Chilena de Nutricion**, vol.29, n.1, p.10-13, abr. 2002.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2ª ed. São Paulo, Atheneu, 1998, 652p.

FAIRWEATHER-TAIT, S. Iron biochemistry. In: **Iron: nutritional and physiological significance**. London, Chapman & Hall, p.1-2, 1995a.

FAIRWEATHER-TAIT, S. Iron absorption. In: **Iron: nutritional and physiological significance**. London, Chapman & Hall, p.3-12, 1995b.

FRAGA, C.G., OTEIZA, P.I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, vol.180, 2002, p. 23-32.

GAUCHERON, F. Iron fortification in dairy industry. **Food Science and Technology**, vol.11, p.403-409, 2000.

GOMES, J.C., SILVA, M.H.L., SILVA, C.O. **Análise de alimentos**. Viçosa, Funarbe, 2003, 154p.

HEDLER, M.C.C.M., JULIANO, Y. E SIGULEM, D.M. Anemia in infancy: etiology and prevalence. **Jornal de Pediatria**, vol. 78, n.4, p.321-326, jun. 2002.

HEIMBACK, J., RIETH, S., MOHAMEDSHAH. F., SLESINSKI, R., SAMUEL-FERNANDO, P., SHEEHAN, T., DICKMANN, R., BORZELLECA, J. Safety assesment of iron EDTA [Sodium Iron (Fe<sup>3+</sup>) Ethylenediaminetetraacetic Acid]: summary of toxicological, fortication and exposure data. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 38, p.99-111, 2000.

HORTON, S., ROSS, J. The economics of iron deficiency. **Food policy**, vol.28, p.51-75, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1985, 533p.

KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara, 1988, 783p.

LEONG, W.I., BOWLUS, C.L., TALLKVIST, J., LÖNNERDAL, B. Iron supplementation during infancy – effects on expression of iron transporters, iron absorption, and iron utilization in rat pups. **American Journal Of Clinical Nutrition**, vol78, p.1203-1211, 2003.

LEVY-COSTA, R.B., MONTEIRO, C.A. Consumo de leite de vaca e anemia na infância no município de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, vol.38, n.6, p.797-803, 2004.

LIMA, A.V.M.S., LIRA, P.I.C., ROMANI, S.A.M., et al. Determinant factors of hemoglobin levels in 12 months old infants in the South of the Zona da Mata of Pernambuco. **Revista de Saúde Materno Infantil**, vol. 4, n.1, p.35-43, jan./mar. 2004.

LOPES, M.C.S., FERREIRA, L.O.C., FILHO, M.B. Uso diário e semanal de sulfato ferroso no tratamento de anemias em mulheres no período reprodutivo. **Cadernos de Saúde Pública**, vol.15, n.4, p. 799-808, oct./dec.1999.

MACHADO, R.M.G., FREIRE, V.H., SILVA, P.C., FIGUERÊDO, D.V., FERREIRA, P.E. **Controle ambiental em pequenas e médias indústrias de laticínios**. Belo Horizonte, Segrac, 2002, 224p.

MACPHAIL, A.P. Iron deficiency and the developing world. **ALAN – Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, vol.51, n.1, supl.1. , p.2-6, mar.2001.

MAHAN, L.K., ARLIN, M.T. **Krause – Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9ª ed. São Paulo, Roca, 1998, 1179p.

MANGUEIRA, T.F.B., TRAVASSOS, A.E.R., FIOREZE, R. et al. Addition of iron to the milk and its retention in the curd. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, vol. 22, n.3, p.305-307, sept./dec. 2002.

MARCHI, R.P., SZARFARC, S.C., RODRIGUES, J.G., MORIMOTO, J.M. Consumo de arroz fortificado com ferro no controle da anemia. In: **Congresso da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição – SBAN, 7**, Belo Horizonte, Anais, p.101, 2003.

MARTINI, F.C.C. Comparação entre a disponibilidade de ferro na presença de vitamina A e beta-caroteno em alimentos e medicamentos. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002. (Tese de mestrado)

MIGLIORANZA, L.H.S., MATSUO, T., CABALLERO-CÓRDOBA, G.M, DICHI, J.B., CYRINO, E.S., OLIVEIRA, I.B.N., MARTINS, M.S., POLEZER, N.M., DICHI, I. Effect of long-term fortification of whey drink with ferrous bisglycinate on anemia prevalence in children and adolescents from deprived areas in Londrina, Paraná, Brazil. **Nutriton**, vol.19, n.5, p.419-421, 2003.

MIRANDA, A.S., FRANCESCHINI, S.C.C., PRIORE, S.E., EUCLYDES, M.P., ARAÚJO, R.M.A., RIBEIRO, S.M.R., NETTO, M.P., FONSECA, M.M., ROCHA, D.S., SILVA, D.G., LIMA, N.M.M., MAFFIA, U.C.C. Anemia ferropriva e estado nutricional de crianças com idade de 12 a 60 meses do município de Viçosa, MG. **Revista de Nutrição**, vol. 16, n.2, p.163-169, abr./jun. 2003.

MIRANDA, L.S. Enriquecimento de alimento à base de leite em pó e fubá de milho com ferro. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1999. (Tese de mestrado)

MONTEIRO, C.A., SZARFAC, S.C. e MONDINI, L. Tendência secular de anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista Saúde Pública**, vol. 34, n.6, supl, p.62-72, dez. 2000.

MUSLIMATUM, S. Nutrition of Indonesian women during pregnancy and lactacion: a focus on vitamin A and iron. Indonésia, Wageningem Universiteit, 2001. (Tese de doutorado)

NAME, J.J. e GUERRA, J.E.F. Uma revisão crítica sobre alimentos fortificados com ferro. **Food Ingredients**, ano 2, n.12, p.56-61, maio/jun. 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Food and Nutrition Board. **Recommended dietary allowances**. 10<sup>a</sup>ed. Washington, National Academic Press, 1989, 284p.

NAYAK, B., NAIR, K.M. In vitro bioavailability of iron from wheat flour fortified with ascorbic acid, EDTA and sodium hexametaphosphate, with or without iron. **Food Chemistry**, vol.810, p. 545-550, 2003.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger – Princípios de bioquímica**. 3ª ed. São Paulo, Editora Metha, 2002, 975p.

NELSON, M. Iron and cancer. In: **Iron: Nutritional and physiological significance**. London, Chapman & Hall, p.88-92, 1995.

NEUMAN, N.A., TANAKA, O.Y., SZARFAC, S.C. et al. Prevalência e fatores de risco para anemia no Sul do Brasil. **Revista Saúde Pública**, vol. 34, n.1, p.56-63, fev. 2000.

OLIVARES G., M., WALTER K., T. Consecuencias de la deficiencia de hierro. **Revista Chilena de Nutrición**, vol.30, n.3, p.226-233, dic. 2003.

OLIVARES, M., PIZARRO F., PINEDA, O., NAMEM J.J., HERTRAMPF, E., WALTER, T. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. **Journal Nutrition**, vol.127, p.1407-1411, 1997.

OSMAN, A.K., AL-OTHAIMEEN, A. Experience with ferrous bis-glycine chelate as an iron fortificant in milk. **International Journal Nutrition Research**, vol. 72, n.4, p. 257-263, 2002.

PASSMORE, R., NICOL, B.M. e NARAYANA RAO, M. **Manual das necessidades nutricionais humanas**. São Paulo, Livraria Atheneu, 1986, 73p.

PINEDA, O., ASHMEAD, H. D., PEREZ, J.M., LEMUS, C.P. Effectiveness of iron amino acid chelate on the treatment of iron deficiency anemia in adolescents. **Journal of Applied Nutrition**, vol. 46, n.1 e 2, p.2-13, 1994.

RAO, B.S.N., PRABHAVATHI, T. An in vitro method for predicting the bioavailability of iron from foods. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol.31, p.169-175, 1978.

RIOS L., E., VEGA B., V., CHADUD M., P., ROMERO D., G. Prevención de deficiencia de hierro em lactantes de bajo peso de nacimiento: comparación de dos métodos de administrar hierro. **Revista Chilena de Pediatría**, vol. 70, n.5, p. 384-389, set. 1999.

SAKAMOTO, L.M. Estudo comparativo entre os aumentos das ferremias, determinados sem administração prévia de ferro; após as administrações de sulfato

ferroso e complexo ferro-peptídeo. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2003. (Tese de doutorado)

SCHLIMME, E., BUCHHEIM, W. **La leche y sus componentes**. Zaragoza, Acribia, 2002, 121p.

SILVA, D.G. Fatores de risco para anemia ferropriva em lactentes do município de Viçosa, Minas Gerais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2003. (Tese de mestrado)

SILVA, M.R., CASTRO, T.G., COSTA, N.M.B., FERREIRA, C.L.L.F., FRANCESCHINI, S.C.C., LEAL, P.F.G., REIS, F.P. The effect of a fermented iron-fortified milky drink on the nutritional status of pre-school children in Viçosa – MG. **Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, vol.23, p.23-32, jun. 2002.

SILVA, P.H.F., PEREIRA, D.B.C., OLIVEIRA, L.L., COSTA JÚNIOR, L.C.G. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. Juiz de Fora, Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, 1997, 190p.

SILVA, P. **Farmacologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1994, 1450p.

SIMÕES, M.C.C., MOURA, E.C.M., SGARBIERI, V.C., FIGUEIREDO, D.B. Avaliação do impacto de um suplemento nutricional rico em ferro hematínico. **Cadernos de Saúde Pública**, vol.15, n.4, p.871-881, oct./dec. 1999.

SOARES, N.T., GUIMARÃES, A.R.P., SAMPAIO, H.A.C. et al. Estado nutricional de lactentes em áreas periféricas de Fortaleza. **Revista de Nutrição**, vol. 13, n.2, p.99-106, maio/ago. 2000.

SOGLIA, S.L.O. Enriquecimento de leite tipo C com ferro aminoácido quelato: biodisponibilidade e características físico-químicas e sensoriais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1996. (Tese de mestrado)

SOUZA, A.I., FILHO, M.B. Diagnóstico e tratamento das anemias carenciais na gestação: consensos e controvérsias. **Revista de Saúde Materno Infantil**, vol. 3, p.473-479, n.4, out./dez. 2003.

SOUZA, M.C.B. Importância da alimentação nas creches e sua contribuição à economia familiar. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1998. (Tese de mestrado)

STEKEL, A., OLIVARES, M., PIZARRO, F., CHADUD, P., LOPEZ, I., AMAR, M. Absorption of fortification iron from milk formulas in infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol.43, p.917-922, 1986.

THURNHAM, D. Iron as a pro-oxidant. In: **Iron: Nutritional and physiological significance**. London, Chapman & Hall, p.33-41, 1995.

TORRES, M.A.A., LOBO, N.F., SATO, K., QUEIROZ, S.S. Fortificação do leite fluido na prevenção e tratamento da anemia carencial ferropriva em crianças menores de 4 anos. **Revista de Saúde Pública**, vol.30, n.4, p.350-357, ago. 1996.

TORRES, M.A.A., SATO, K., LOBO, N.F., QUEIROZ, S.S. Efeito do uso de leite fortificado com ferro e vitamina C sobre os níveis de hemoglobina e condição nutricional de crianças menores de 2 anos. **Revista de Saúde Pública**, vol.29, n.4, p.301-307, ago. 1995.

TORRES, M.A.A., SATO, K., JULIANO, Y., QUEIROZ, S.S. Terapêutica com doses profiláticas de sulfato ferroso como medida de intervenção no combate à carência de ferro em crianças atendidas em unidades básicas de saúde. **Revista de Saúde Pública**, vol.28, n.6, p.410-415, dez. 1994.

TUMA, R.B., YUYAMA, L.K.O., AGUIAR, J.P.L., MARQUES, H.O.. Impacto da farinha de mandioca fortificada com ferro aminoácido quelato ao nível de hemoglobina de pré-escolares. **Revista de Nutrição**, vol. 16, n.1, p.29-39, jan./mar. 2003.

UCHIMURA, T.T., SZARFAC, S.C., LACTORRE, M.R.D.O. et al. Anemia e peso ao nascer. **Revista Saúde Pública**, vol. 37, n.4, p.397-403, ago. 2003.

WARD R. Iron overload and toxicity. In: **Iron: Nutritional and physiological significance**. London, Chapman & Hall, p.50-53, 1995.

YBARRA, L.M., COSTA, N.M.B., FERREIRA, C.L.L.F. Calcium and iron interaction: a review. **Journal of Brazilian Society Food Nutrition**, v.22, p.85-107, 2001.