



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

SARAH RAMOS CORRÊA

**BIODISPONIBILIDADE DE FERRO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE MISTURAS DE
FEIJÕES CAUPI E BATATA DOCE BIOFORTIFICADOS**

ALEGRE- ES
FEVEREIRO - 2018

SARAH RAMOS CORRÊA

**BIODISPONIBILIDADE DE FERRO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE MISTURAS DE
FEIJÕES CAUPI E BATATA DOCE BIOFORTIFICADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Neuza Maria Brunoro Costa
Coorientadora: Prof^a. Maria das Graças Vaz Tostes e Priscila Brigide

ALEGRE-ES
FEVEREIRO - 2018

SARAH RAMOS CORRÊA

**BIODISPONIBILIDADE DE FERRO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE MISTURAS DE
FEIJÕES CAUPI E BATATA DOCE BIOFORTIFICADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 18 de dezembro de 2017

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientadora)

Dra. Priscila Brigide
Universidade Federal do Espírito Santo
(Coorientadora)

Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa
Universidade Federal do Espírito Santo
(Examinador)

Profa. Dra. Daniela da Silva Oliveira
Universidade Federal do Espírito Santo
(Examinadora)

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, Emilson e Clarice, por me ensinarem, todos os dias, que “aprender não ocupa espaço”. Esse sonho é fruto dos valores enraizados em mim por vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o ponto de partida de todos os meus projetos de vida.

Aos meus pais, Emilson e Clarice, por não medirem esforços para investir nos meus sonhos, pela fé inabalável nas minhas conquistas e por energizar os meus dias com sorrisos orgulhosos. A minha irmã Kamila, pelo amor de mãe à distância. Aos meus sobrinhos, por entenderem minha ausência.

À minha orientadora, Neuza Maria Brunoro Costa, pela dose diária de ética, competência e dedicação, ensinando com humildade como ser um bom professor-pesquisador. Levo comigo muita admiração e orgulho!

À professora Hércia Stampini Duarte Martino, por permitir que parte do trabalho tenha sido executado nos laboratórios da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e à Renata e a Elisa, pela ajuda e orientação durante as análises realizadas.

Às minhas coorientadoras Maria das Graças Vaz Tostes e Priscila Brigide, pelas colaborações desde a escrita do projeto até a execução do mesmo.

Aos professores Daniela da Silva Oliveira e Sérgio Henrique Saraiva pelos ensinamentos e receptividade ímpar em todos os momentos em que precisei.

Aos técnicos Eduardo, Euziane e Amanda por todo o auxílio, suporte e atenção em cada análise. Às meninas que me ajudaram durante todo o experimento, Cíntia e Paula. Aos professores e colegas que estiveram juntos no último dia do experimento: professores André e Mirelle, Thaísa.

Às amigas da graduação (Desirre Moraes), às amigas da vida (Desirée Barros) e às amigas do mestrado (Rafaela e Kátia), minhas amigas mestres e doutorandas, obrigada pelos ensinamentos de quem já passou por esta fase, pelas palavras de apoio, pelas gargalhadas e noites gourmet! Vocês são o reflexo do carinho de Deus comigo.

Aos professores André Gustavo Vasconcelos Costa e Daniela da Silva Oliveira, e a minha coorientadora Priscila Brigide, por aceitarem participar da banca de defesa e contribuir com este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e

a Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pela concessão da bolsa de estudos e fomento à pesquisa e financiamento do projeto.

A todos que participaram e contribuíram para que esse projeto acadêmico e de vida se concluísse. Muito obrigada.

EPÍGRAFE

“Feliz do homem que encontrou a sabedoria, daquele que adquiriu a inteligência, porque mais vale este lucro que o da prata, e o fruto que se obtém é melhor que o fino ouro.”
(Provérbios, 3:13-14)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da absorção de ferro em indivíduos normais.....	6
Figura 2- Fluxograma das etapas da metodologia do presente estudo.....	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Misturas de alimentos biofortificados (X, T, A BB) ou convencionais (A, G)	15
Tabela 2- Composição das dietas experimentais (g/kg).....	27
Tabela 3- Composição nutricional das farinhas das amostras em base seca	29
Tabela 4- Razão molar das dietas experimentais	30
Tabela 5- Teor de ferro das dietas experimentais (mg/Kg)	31
Tabela 6-. Ingestão alimentar total, ganho de peso total (GP total) e ingestão de ferro.....	32
Tabela 7 – Concentração de hemoglobina, Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE) e Valor Biológico Relativo de HRE (RBV – HRE).....	33
Tabela 8 – Resultado das análises <i>in vitro</i> e expressão gênica de ferritina e transferrina.....	35

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Biofortificação	4
3.2 Metabolismo do ferro	5
3.2.1 Funções	5
3.2.2 Absorção e transporte	6
3.2.3 Regulação celular e sistêmica do metabolismo de ferro	8
3.3 Interação vitamina A e ferro	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Alimentos Teste	13
4.2 Preparo das farinhas dos alimentos	14
4.2.1 Arroz.....	14
4.2.2 Feijões.....	14
4.2.3 Batata Doce	15
4.3 Misturas experimentais	15
4.4 Determinação da composição química dos alimentos.....	15
4.4.1 Umidade.....	15
4.4.2. Cinzas	16
4.4.3 Proteínas.....	16
4.4.4 Minerais.....	16
4.4.5 Compostos fenólicos totais	16
4.4.6 Fibra alimentar	17
4.4.7 Fitatos	19
4.4.8 Lipídios.....	19
4.4.9 Carboidratos.....	20

4.5 Razão molar fitato/ferro	20
5. Planejamento Experimental.....	20
5.1 Estudo <i>in vitro</i>	20
5.1.1 Teor de ferro na fração digerível	20
5.1.2 Biodisponibilidade <i>in vitro</i>	20
5.1.3 Avaliação <i>in vitro</i> de biodisponibilidade de ferro	20
5.1.4 Colheita de caco-2 células para análise de ferritina.....	22
5.2 Estudo <i>in vivo</i>	22
5.2.1 Ensaio biológico	22
5.2.2 Hemoglobina	24
5.2.3 Eficiência na regeneração de hemoglobina (HRE)	24
5.2.4 Análise biomolecular	24
6 Análise Estatística dos Dados	26
7 Aspectos Éticos.....	26
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
9. CONCLUSÃO	39
APÊNDICE.....	50

RESUMO

RAMOS CORRÊA, SARAH. **Biodisponibilidade de ferro *in vitro* e *in vivo* de misturas de feijão caupi e batata doce biofortificados**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa. Coorientadoras: Profa. Dra. Maria das Graças Vaz Tostes e Priscila Brigide.

A biofortificação de alimentos é um aliado no combate à deficiência de micronutrientes. No Brasil, alimentos básicos são produzidos com maiores teores de ferro, zinco e vitamina A, mas pouco se sabe acerca da biodisponibilidade desses nutrientes e suas interações. O objetivo do estudo foi avaliar a interação da vitamina A na biodisponibilidade de ferro de misturas de arroz convencional, feijão caupi e batata doce biofortificados com ferro e carotenoides provitamina A, respectivamente, usando métodos *in vitro* e *in vivo*, bem como avaliar a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro. Os alimentos foram submetidos a cocção úmida e secos em estufa a 60°C. Foram analisados a composição nutricional, fitatos, fenólicos totais, ferro e zinco das farinhas dos alimentos. As combinações utilizadas no experimento consistiram de arroz + feijão caupi adicionadas ou não de batata doce. A biodisponibilidade *in vitro* dos feijões caupi Guariba (G), Aracê (A), Xique Xique (X), e Tumucumaque (T) foi avaliada por meio de células Caco-2. No ensaio biológico foram testados nove grupos experimentais (n=8): Arroz + Caupi BRS Guariba (G); Arroz + Caupi BRS Guariba + Batata Doce (GB); Arroz + Caupi BRS Aracê (A); Arroz + Caupi BRS Aracê + Batata Doce (AB); Arroz + Caupi BRS Xique Xique (X); Arroz + Caupi BRS Xique Xique + Batata Doce (XB); Arroz + Caupi BRS Tumucumaque (T); Arroz + Caupi BRS Tumucumaque + Batata Doce (TB); Controle (Sulfato Ferroso). Apenas o caupi BRS Xique Xique (X) apresentou maior biodisponibilidade de ferro *in vitro* na ausência de batata doce quando comparado à mistura com a batata (XB). Os demais grupos adicionados de batata doce não diferiram entre si, bem como os grupos sem a batata, e um comparado ao outro. O ensaio *in vivo* contemplou o método de depleção/repleção (período de 35 dias), com os mesmos grupos analisados no ensaio *in vitro*. Ainda, foram avaliados os índices: Ganho de Hemoglobina (Ganho de Hb), Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE) e Valor Biológico Relativo do HRE (RBV-HRE). A expressão gênica das proteínas transferrina e ferritina foi avaliada por meio de RT-PCR. O ganho de Hb dos grupos experimentais não diferiu do controle ($p \geq 0,05$). Os grupos teste apresentaram níveis similares de HRE ($p \geq 0,05$). A biodisponibilidade *in vivo* foi maior para o grupo controle ($p < 0,05$), enquanto os grupos adicionados de batata não diferiram entre si ($p \geq 0,05$). O único grupo que diferiu de sua contraparte sem batata doce foi o XB ($p < 0,05$). A expressão de mRNA para ferritina não diferiu entre os grupos teste e o controle ($p \geq 0,05$). No que se refere à expressão de mRNA para transferrina, houve diferença entre os grupos teste e o controle ($p < 0,05$) exceto para o grupo Xique Xique ($p < 0,05$). A associação de arroz e feijão, e estes a batata doce rica em carotenoides não favoreceu a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, assim como a biodisponibilidade deste mineral.

Palavras-chave: ferro, carotenoides, biodisponibilidade, biofortificação, expressão gênica.

ABSTRACT

RAMOS CORRÊA, SARAH. ***In vitro* and *in vivo* iron bioavailability of biofortified cowpea and sweet potato blends.** 2017. Dissertation (MSc Food Science and Technology) – Federal University of Espírito Santo, Alegre – ES. Advisor: Prof. Dr. Neuza Maria Brunoro Costa. Co-advisor: Prof. Dr. Maria das Graças Vaz Tostes and Priscila Brigide.

Food biofortification is an ally in the fight against micronutrient deficiency. In Brazil, staple crops are produced with higher levels of iron, zinc and vitamin A, but little is known about the bioavailability of these nutrients and their interactions. The aim of the study was to evaluate the interaction of vitamin A in the bioavailability of iron from mixtures of conventional rice with – biofortified cowpea beans and sweet potato with iron and carotenoids pro vitamin A, respectively, using *in vitro* and *in vivo* methods, as well as evaluate the gene expression of proteins involved in iron metabolism. The foods were cooked and dried at 60°C. The nutritional composition, phytates, total phenolics, iron and zinc of food flours were analyzed. The combinations used in the experiment consisted of rice + cowpea added or not of sweet potatoes. *In vitro* bioavailability of cowpea bean Guariba (G), Aracê (A), Xique Xique (X) and Tumucumaque (T) was assessed by Caco-2 cells. In the biological assay nine experimental groups (n = 8) were tested: Rice + Cowpea BRS Guariba (G); Rice + Cowpea BRS Guariba + Sweet Potato (GB); Rice + Cowpea BRS Aracê (A); Rice + Cowpea BRS Aracê + Sweet Potato (AB); Rice + Cowpea BRS Xique Xique (X); Rice + Cowpea BRS Xique Xique + Sweet Potato (XB); Rice + Cowpea BRS Tumucumaque (T); Rice + Cowpea BRS Tumucumaque + Sweet Potato (TB); Control (Ferrous Sulfate). Only the BRS Xique Xique cowpea presented higher bioavailability of iron *in vitro* in the absence of sweet potato compared to the blend with the potato. The other groups added of sweet potato did not differ among themselves, as well as the groups without the potato, and one compared to the other. Bioavailability of iron *in vivo* was assessed by the depletion/repletion method (period of 35 days). Hemoglobin Gain (Hb Gain), Hemoglobin Regeneration Efficiency (HRE) and Relative Biological Value of HRE (RBV-HRE) were evaluated. The gene expression of the transferrin and ferritin proteins were evaluated by RT-PCR. The Hb gain of the experimental groups did not differ from the control ($p \geq 0.05$). The test groups presented similar levels of HRE ($p \geq 0.05$). The *in vivo* bioavailability was higher for the control group ($p < 0.05$), while the potato groups did not differ ($p \geq 0.05$). The only group that differed from its counterpart without sweet potato was XB ($p < 0.05$). mRNA expression of ferritin did not differ between the test and control groups ($p \geq 0.05$). In what it refers to mRNA expression of transferrin, in which there was difference between the test and control groups ($p < 0.05$), except the group Xique Xique ($p < 0.05$). The association of rice and beans to sweet potato rich in carotenoids, did not favor the gene expression of proteins involved in the metabolism of iron, as well as the bioavailability of this mineral.

Keywords: iron, carotenoids, bioavailability, biofortification, gene expression.

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo, principalmente pré-escolares e gestantes, são afetadas pela deficiência crônica de ferro, zinco e vitamina A, sobretudo em países subdesenvolvidos (ALFEREZ *et al.*, 2011; MURGIA *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2009; SINGH, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2016).

A anemia por deficiência de ferro possui um alto custo social, dado que compromete o rendimento de trabalho, o comportamento e desempenho intelectual, a imunidade e a resistência a infecções. Ademais, argumenta-se que a baixa disponibilidade do ferro dietético exerce maior influência comparada a baixa ingestão do mesmo. Dessa maneira, estratégias têm surgido no sentido de aumentar a ingestão deste mineral, bem como melhorar a sua biodisponibilidade (CASGRAIN *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2013; MAHLERA; SHULERB; GLAHNC, 2009).

Outrossim, a hipovitaminose A ocasiona a xeroftalmia, cegueira e morte em milhares de crianças no mundo e constitui um dos principais problemas nutricionais de populações de países em desenvolvimento, como o Brasil (AMBROSIO, 2006). Ramalho e colaboradores (2002) identificaram que, em todas as regiões brasileiras para as quais existem dados, foi constatada a carência marginal de vitamina A, com alta prevalência em diferentes faixas etárias. Embora haja grande disponibilidade de frutas e verduras, fontes de carotenóides no Brasil, a hipovitaminose A constitui um grave problema de saúde pública.

A biofortificação de culturas de alimentos básicos é abordagem de saúde pública para controlar a deficiência de vitamina A, ferro e zinco em países pobres. Esse processo consiste no desenvolvimento de alimentos com maiores concentrações de micronutrientes, como vitaminas e minerais, utilizando o melhoramento convencional de plantas e técnicas de biotecnologia (BOUIS *et al.*, 2011; FRANO *et al.*, 2014).

Visto que a vitamina A atua sobre a expressão gênica de proteínas do metabolismo de ferro, e a hipovitaminose A e a anemia podem coexistir, o desenvolvimento de alimentos biofortificados com ferro e com carotenóides

provitamina A pode contribuir para aumentar o conteúdo desses nutrientes da dieta e melhorar a saúde da população. Entretanto, existe a necessidade de avaliar o efeito das interações entre alimentos biofortificados consumidos na mesma dieta, posto que o consumo concomitante de alimentos influencia a biodisponibilidade dos nutrientes (AMENY *et al.*, 2002; CASGRAIN *et al.*, 2010).

O aumento da concentração de ferro em culturas alimentares não necessariamente traduz um aumento proporcional do ferro absorvido, já que variedades de culturas com altas concentrações de ferro podem ter concentrações aumentadas ou diminuídas de inibidores ou potencializadores da absorção de ferro (MOURA; CANNIATTI-BRAZACA, 2006; ARIZA-NIETO *et al.*, 2007).

Neste contexto, a hipótese do estudo baseia-se na premissa de que: i) a biodisponibilidade de ferro difere-se entre as combinações alimentares, sendo maior nas misturas com alimentos biofortificados com carotenoides provitamina A; ii) a concentração de fitato e de polifenóis, e a razão molar fitato:ferro não reduzirá a biodisponibilidade de minerais das combinações alimentares; iii) ocorrerá aumento da expressão das proteínas envolvidas no metabolismo de ferro no tecido hepático de animais após a ingestão do feijão caupi biofortificado adicionado de arroz e batata doce biofortificada com carotenoides provitamina A.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a biodisponibilidade de ferro *in vitro* e *in vivo* de misturas de feijões caupi e batata doce biofortificados.

2.2 Específicos

- Determinar os teores de micronutrientes (ferro, zinco e provitamina A), fitato, compostos fenólicos e fibra alimentar dos alimentos biofortificados (batata doce e feijões-caupi BRS Aracê, BRS Xiquexique e BRS Tumucumaque) e convencionais (feijão-caupi Guariba) e arroz convencional;
- Avaliar a biodisponibilidade de ferro dos feijões-caupi biofortificados e suas contrapartes convencionais, adicionado de arroz convencional, na presença ou ausência de pró-vitamina A (batata doce biofortificada), em modelo *in vivo*;
- Avaliar o teor de ferro na fração digerível e biodisponibilidade do ferro das misturas de feijão, batata-doce e arroz e suas contrapartes sem a batata doce em modelo *in vitro*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biofortificação

A fortificação, enriquecimento ou simplesmente adição é um processo no qual é acrescido ao alimento, dentro dos parâmetros legais, um ou mais nutrientes, contidos ou não naturalmente neste, com o objetivo de reforçar seu valor nutritivo (MARQUES *et al.*, 2012). Aliados a esta, a biofortificação constitui uma intervenção sustentável, econômica e acessível às famílias de baixo poder aquisitivo (BOUIS, *et al.*, 2011; PFEIFFER, 2015), além de apresentar boas qualidades agrônomicas, como rendimento, resistência à secas e pragas (NUTTI; GONZALEZ, 2015).

A biofortificação no que lhe concerne, é uma técnica que se baseia no melhoramento genético de plantas convencionais para aumentar a densidade de nutrientes em suas porções comestíveis, especialmente vitaminas e minerais, em alimentos básicos. As culturas produzidas apresentam maiores teores de micronutrientes reconhecidos como limitantes pela Organização Mundial da Saúde especialmente ferro, zinco e vitamina A (HARVEST PLUS, 2016; PFEIFFER; MCCLAFFERTY, 2007; ROCHA, *et al.*, 2008;).

No Brasil, as atividades dos projetos de biofortificação HarvestPlus e BioFORT são coordenadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em que são pesquisados a batata doce com maior teor de carotenóides e feijão-caupi com teores mais elevados de ferro e zinco, dentre outros alimentos (NUTTI, 2009; SINGH, *et al.*, 2016). A partir dessas culturas, ainda podem ser desenvolvidos produtos enriquecidos com os alimentos biofortificados (CAVALCANTE *et al.*, 2016).

O feijão-caupi, *Vigna unguiculata (L.) Walp* é oriundo da África e foi introduzido no Brasil no estado da Bahia (FILHO, 2011), sendo conhecido como feijão-de-corda no Nordeste e feijão fradinho no Sudeste (EMBRAPA, 2016). Em 2008, duas linhagens de feijão-caupi, classe branca, foram lançadas como cultivares comerciais BRS Xiquexique (7,7 mg/100g de ferro e 5,3 mg/100g de zinco no grão cru) e BRS Tumucumaque (6,0 mg/100g de ferro e 5,1 mg/100g de zinco no grão cru). Essas variedades são ricas em ferro e zinco, além de apresentar alta

produtividade e adaptabilidade às regiões em crescimento. No ano de 2009, surgiu a cultivar de grão verde BRS Aracê (6,1 mg/100g de ferro e 4,8 mg/100g de zinco no grão cru) (ROCHA et al., 2001). Todas possuem altos teores protéicos (23%), baixo conteúdo lipídico (1,7 a 3%), compostos fenólicos e rápido cozimento (BARROS et al., 2013; EMBRAPA, 2008; EMBRAPA, 2009). O feijão BRS Guariba é a cultivar convencional e apresenta cerca de 7mg de ferro/100g e 3 mg de zinco/100g da farinha integral do grão (LEAL *et al.*, 2013).

Em linhas gerais, os feijões caupi são boas fontes de fibras insolúveis, possuem maior proporção de ácidos graxos insaturados com relação aos saturados, além de cálcio, fósforo, potássio e manganês (FROTA et al., 2008).

A batata doce Beaugard é uma cultivar biofortificada com provitamina A. Apresenta em média 115 µg de β-caroteno/g de raiz fresca, o equivalente a cerca de 10 vezes mais carotenoides do que a batata doce convencional (ALVES et al., 2012).

3.2 Metabolismo do ferro

3.2.1 Funções

O ferro dietético existe sob as formas heme, encontrado em carnes e derivados, e não heme, proveniente dos demais alimentos de origem animal e os de fontes vegetais. A forma química destes elementos interfere diretamente na absorção dos mesmos, sendo o primeiro mais eficaz que o segundo (PIZARRO et al., 2016; SHAYEGHI et al., 2005).

Este é um micromineral ou elemento traço, altamente reativo, uma vez que é capaz de interagir com o oxigênio e formar compostos capazes de danificar membranas celulares e o DNA. Por este motivo, está frequentemente ligado às proteínas e enzimas e não na forma iônica no organismo (MAHAN *et al.*, 2013; ABRAMOWSKI *et al.*, 2014).

Dentre as proteínas que contêm ferro, as principais incluem: as que contêm o grupo heme, como a hemoglobina, mioglobina e citocromos; enzimas contendo ferro e enxofre, como as flavoproteínas; e proteínas de armazenamento, como a transferrina, lactoferrina, ferritina e hemossiderina. Os ligantes do elemento ferro no

sistema biológico são o oxigênio, nitrogênio e enxofre e, por isso, as funções deste metal estão relacionadas ao transporte de oxigênio e reações de redução e oxidação, como as que ocorrem com a hemoglobina e citocromos, respectivamente (COZZOLINO, 2016).

3.2.2 Absorção e transporte

Uma vez presente no lúmen intestinal, o ferro é captado pela superfície apical dos enterócitos por meio de transportadores específicos. Na forma heme será transportado pelo HCP1 (heme carrier protein), e na forma não heme pelo DMT-1 ou DCT1 (divalent metal transporter-1) (SHAYEGHI *et al.*, 2005). Além disso, a membrana dos enterócitos também expressa a proteína Dcytb (Duodenal cytochrome B), responsável por reduzir o ferro férrico (Fe^{+3}) para sua forma ferrosa (Fe^{2+}), antes de ser transportado pela DCT1 (ANDERSON & VULPE, 2009). A figura 1 ilustra a absorção de ferro pelo enterócito e sua exportação.

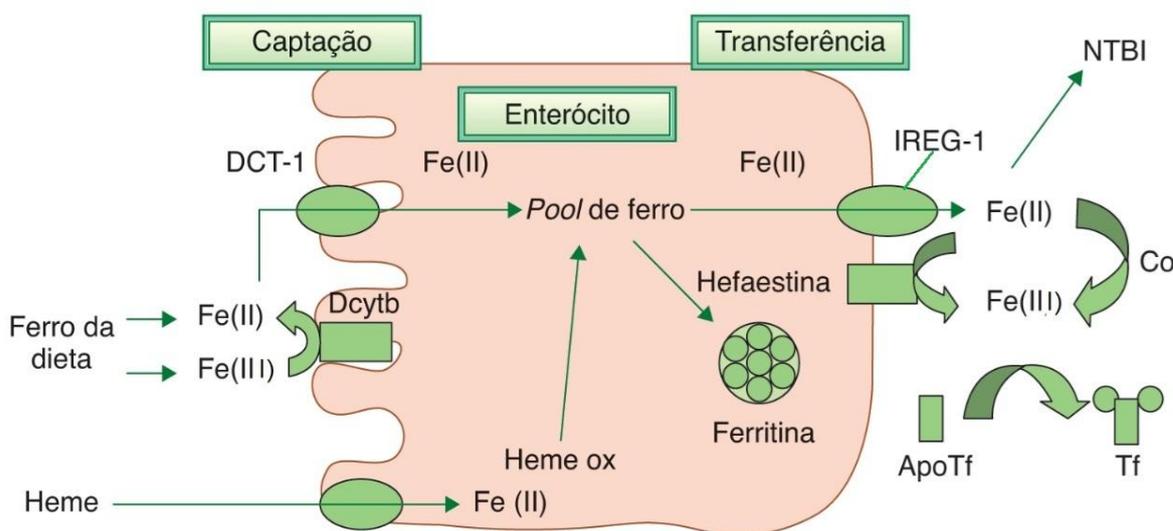


Figura 1 – Representação esquemática da absorção de ferro. O ferro é captado do trato digestório tanto na forma heme como não heme. O heme é degradado pela heme oxigenase (Heme ox), liberando Fe^{2+} , enquanto o ferro não heme é reduzido pelo citocromo b duodenal (Dcytb) e transportado por meio da membrana apical pelo transportador de cátions divalentes (DCT-1). Dentro do enterócito, o *pool* de ferro pode ser equilibrado com o estoque intracelular na forma de ferritina. Na membrana basolateral, o ferro é

transportado para fora da célula pela proteína transportadora regulada pelo ferro-1 (IREG-1 ou ferroportina) ou ferroportina e sua incorporação à transferrina (Tf) é facilitada pelas ferroxidases hefaestina e ceruloplasmina (Cp). NTBI = ferro não ligado à transferrina (SHILS, 2002).

No interior da célula, o ferro é separado da porfirina pela enzima heme oxigenase e fará parte do mesmo pool de ferro não heme, podendo assim, ser armazenado como ferritina ou incorporado em outras proteínas de transporte e pontes de ferro-enxofre na mitocôndria ou no citosol (ROUGHEAD *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2013). Entretanto, a maior parte do ferro intracelular é canalizado para a mitocôndria, onde ocorre a síntese do heme e dos centros ferro-enxofre (HENTZE *et al.*, 2004).

A passagem do ferro para o plasma ocorre pela membrana basolateral, pela ação da proteína ferroportina (FPN ou IREG-1), ou, caso isso não ocorra e não haja apoferritina livre, o ferro é eliminado do organismo durante a descamação dos enterócitos no lúmen intestinal, uma vez que estes têm uma vida útil limitada (ROUGHEAD *et al.*, 2002; DONOVAN *et al.*, 2005). Este processo previne o corpo de uma absorção excessiva de ferro (ANDERSON & VULPE, 2009).

Em meio à demanda corporal de ferro, este mineral é liberado do enterócito pela ferroportina, em um processo dependente da hefaestina, uma oxidase homóloga à ceruloplasmina sérica (ANDERSON & VULPE, 2009). Estes dois processos ocorrem juntos, pois a transferrina sérica, glicoproteína responsável pelo transporte de ferro na circulação sanguínea (HENTZE *et al.*, 2004), tem alta afinidade pelo ferro na forma férrica (Fe^{3+}). Assim, mutações que inativam a ferroportina ou hefaestina, têm como consequência o acúmulo de ferro nos enterócitos (GROTTO, 2008).

Sobre a transferrina (Tf), sua ligação ao ferro o torna solúvel a fim de ser distribuído para as células, limitando a geração de radicais livres pelo ferro na forma iônica. A Tf se liga ao receptor de transferrina 1 (TfR1) nas superfícies celulares e, por meio de uma endocitose mediada pelo receptor e o ferro, o complexo Tf-Fe é internalizado e a Tf é liberada com a redução do pH endossomal, promovido pela STEAP 3, uma redutase endossomal (FANG *et al.*, 2013). O transportador DMT-1 também participa da absorção de ferro mediada pela TfR (BOGDAN *et al.*, 2016).

A transferrina pode ser saturada com ferro em até 30%. Uma saturação de

45% indica sobrecarga de ferro e, caso exceda 60% dos sítios de ligação, o ferro livre inicia o acúmulo na circulação, podendo danificar membranas celulares (HENTZE *et al.*, 2010). Em contrapartida, uma baixa saturação da transferrina (<30%) estimula as células absorptivas a captar e transportar ferro para a corrente sanguínea (MAHAN *et al.*, 2013). Distúrbios na homeostase de ferro podem causar doenças, como a anemia ferropriva e hemocromatose (QIN *et al.*, 2013).

O ferro heme é reciclado dos eritrócitos senescentes pelos macrófagos retículo-endoteliais (RE). Estes expressam TfRs de superfície e captam o mineral da circulação ao provocar a lise das moléculas de hemoglobina por meio de uma heme oxigenase. O ferro recuperado pode ser retido como ferritina ou ser liberado no plasma, onde é oxidado pela ceruloplasmina e transportado pela transferrina para ser reutilizado (FLEMING & SLY, 2001).

As moléculas de ferritina, em excesso, podem se aglomerar e formar a hemossiderina, um compartimento maior. Ambas ferritina e hemossiderina são passíveis de mobilização pelas células mediante a demanda de ferro (ANDERSON & VULPE, 2009). A sobrecarga de ferro no organismo torna o ferro livre disponível nos tecidos, o que favorece a produção de radicais livres e consequente dano oxidativo a lipídeos, proteínas e DNA (XU *et al.*, 2012).

3.2.3 Regulação celular e sistêmica do metabolismo de ferro

Para que ocorra a homeostase celular de ferro é necessário o controle da captação, armazenamento e, principalmente, exportação ou transporte deste mineral para os tecidos (CHUNG & WESSLING-RESNICK, 2003; DONOVAN *et al.*, 2005). Como o organismo não possui um sistema eficaz de excreção do ferro, sua absorção precisa ser controlada. Por isso, cerca de 1-2mg de ferro diário é incorporado pela absorção intestinal, aproximadamente 10% das necessidades diárias, enquanto o restante vem da ação dos macrófagos (HENTZE *et al.*, 2010; CAMASCHELLA *et al.*, 2016). De mesmo modo, quando a reciclagem de ferro pelos macrófagos é insuficiente para satisfazer a demanda eritróide, a absorção intestinal se torna primordial (ANDERSON & VULPE, 2009).

Zooler e colaboradores (2002) investigaram, em células Caco-2, os efeitos

das flutuações de ferro na expressão de proteínas presentes no metabolismo deste mineral. Foi observado que o ferro regula, indiretamente, a expressão de DMT1 e ferroportina, afetando sua transcrição. Isto sugere que a absorção intestinal de ferro é regulada pelas demandas corporais de ferro.

A homeostase de ferro é controlada por mecanismos de transcrição que regulam a expressão gênica das proteínas envolvidas no metabolismo deste mineral (TAKO *et al.*, 2013). O citocromo b duodenal (Dcytb), a proteína transportadora de metal divalente (DMT-1), ferroportina e hefaestina duodenal (Heph) são proteínas que regulam a absorção de ferro, enquanto a transferrina e a ferritina são proteínas sintetizadas no fígado e atuam no transporte e armazenamento de ferro, respectivamente (TAKO *et al.*, 2013; GROTTTO, 2008).

Tem sido demonstrado que a expressão e regulação dos genes da DMT1, TfR2, FPN1, Heph e hepcidina (Hamp) são tecido-específicos e sua expressão pode ser influenciada direta ou indiretamente pelos níveis de ferro corporal (QIN *et al.*, 2013). Estes mecanismos regulatórios envolvem a modulação da transcrição, estabilidade do mRNA, tradução e modificações pós-transcricionais (HENTZE *et al.*, 2004)

O metabolismo de ferro possui um mecanismo regulatório sistemático, regido pelo hormônio hepcidina e a proteína ferroportina, e outro celular, coordenado pelas proteínas reguladoras do ferro (IRPs) e seus respectivos elementos responsivos ao ferro (IREs), localizados nas porções não traduzidas do RNA que codificam proteínas relacionadas ao ferro (HENTZE *et al.*, 2010).

A expressão dos IRPs é controlada pelos IREs. Essas detectam as concentrações citosólicas de ferro e regulam a expressão pós-transcricional de genes do metabolismo de ferro, a fim de otimizar a disponibilidade de ferro celular. Desta forma, uma queda nos níveis de ferro estimula a ativação dos IRPs, que por sua vez se ligam aos IREs na sequência do mRNA da ferritina, reprimindo-a, e dos receptores de transferrina, estimulando-os. Isto aumenta a captação de ferro e reduz o armazenamento do mesmo. Uma situação oposta é observada em altos níveis de ferro (ROUAULT, 2006).

A hepcidina é um hormônio peptídico regulatório, secretado pelo fígado

mediante ao aumento de ferro intra e extracelular (NEMETH *et al.*, 2004; ABRAMOWSKI *et al.*, 2014), cuja função é se ligar à ferroportina na membrana de células alvo, como macrófagos, enterócitos e hepatócitos, promovendo a sua internalização e degradação (DETIVAUD *et al.*, 2005). Este processo limita o efluxo de ferro para o plasma de forma sistêmica ao reduzir a absorção no duodeno, reciclagem pelos macrófagos e exportação dos estoques hepáticos (MEYNARD *et al.*, 2014). O ferro acumulado nos enterócitos conduz à menor síntese de DMT1 (ANDERSON & VULPE, 2009).

Uma ação ineficiente da hepcidina promove o acúmulo de ferro tecidual e desordens como a hemocromatose, enquanto a sua superprodução pode levar a hipoferremia. De modo contrário, em processos com alta demanda de ferro, como a eritropoiese, os níveis de hepcidina são baixos (ABRAMOWSKI *et al.*, 2014). Enquanto o sistema IRP/IRE protege as células contra perdas significativas de ferro, a hepcidina preserva o organismo quanto à sobrecarga sistêmica deste mineral (HENTZE *et al.*, 2010).

Donovan e colaboradores (2005) estudaram um rato mutante que expressa ferroportina em todos os tecidos, exceto o intestino, para determinar quais tipos celulares são dependentes desta enzima. Macrófagos do fígado e do baço apresentaram retenção de ferro, pois fagocitaram eritrócitos, mas não possuíam um mecanismo de liberação do mesmo, sugerindo que, assim como nos enterócitos, a ferroportina é o principal exportador de ferro reciclado pelos macrófagos e hepatócitos.

DU *et al* (2012) observaram em macrófagos J774 o efeito inibidor da hepcidina sobre a expressão do receptor de transferrina 1 (TfR1), DMT1 e ferroportina, elucidando os efeitos da mesma sobre a exportação e captação de ferro celular.

Sonnweber e colaboradores (2012) encontraram maiores níveis de mRNA de hepcidina no fígado de ratos suplementados com ferro comparados aos animais que receberam doses normais desse mineral, indicando a influência da sobrecarga de ferro sobre a sua síntese.

3.3 Interação vitamina A e ferro

Os retinóides, ou vitamina A, agrupam três compostos com atividade metabólica: o álcool (retinol), o aldeído (retinal ou retinaldeído) e o ácido (ácido retinóico). Essas formas ativas de vitamina A provém de fontes animais e são armazenadas como retinil palmitato, acopladas a proteínas nos alimentos. Já nos vegetais, os compostos com atividade de vitamina A são os carotenóides (MAHAN *et al.*, 2013).

A vitamina A regula a expressão de genes relacionados ao metabolismo e ferro, como o mRNA da Hamp, que codifica o hormônio hepcidina (CUNHA, 2013). Sua deficiência tem sido associada a baixo percentual de saturação de transferrina e capacidade de ligação de ferro, mas não a baixas concentrações de transferrina circulante (MEJIA & CHEW, 1988).

No estudo de MED e colaboradores (2012), animais alimentados com dietas deficientes em vitamina A apresentaram redução nas concentrações séricas de ferro e ferritina e aumento na concentração de ferro no fígado e baço, exibindo o aprisionamento de ferro nestes órgãos e liberação ineficiente para a eritropoiese na medula óssea. Além disso, análises de expressão gênica mostraram que o ácido transretinóico foi capaz de reduzir o mRNA de IRP em hepatócitos de maneira dose-dependente, quanto maior a concentração, menores os níveis de mRNA IRP.

Genes responsáveis pelas proteínas de regulação metabólica de ferro nos tecidos (IRP), receptores de transferrina (TfR) e ferritina (Fn) podem ter sua expressão modulada pela vitamina A (MED *et al.*, 2012), bem como a proteína transportadora de metal divalente (DMT-1), responsável pela incorporação celular do ferro heme, e a enzima redutase citocromo b duodenal (Dcytb), cuja função é converter o ferro inorgânico (Fe^{3+}) para a forma heme (Fe^{2+}) (GROTTO, 2008).

Arruda e colaboradores (2009) avaliaram ratos deficientes em vitamina A e ratos deficientes em vitamina A e ferro. Foi observado, apenas em animais com déficit de vitamina A, aumento do mRNA de hepcidina hepática e das concentrações de ferro no baço. Ao passo que, em ratos com ambas as carências, houve inibição da expressão de hepcidina e aumento nos níveis de mRNA da proteína DMT-1, sugerindo a modulação da vitamina A na homeostase de ferro por meio da

expressão de hepcidina.

Ao avaliar animais com deficiência de vitamina A, Cunha e colaboradores (2013) observaram aumento na concentração de ferro no baço, redução dos níveis de mRNA de hepcidina hepática e eritropoietina renal, aumento dos níveis de mRNA de ferroportina no baço e de heme-oxigenase 1 no fígado e no baço, comparado aos ratos controle. Esses resultados sugerem que a deficiência de vitamina A causa uma eritropoiese ineficaz, com má-formação de eritrócitos e consequente acúmulo de ferro heme no baço desses ratos, o que promove deficiência sistêmica de ferro.

Schroeder et al., (2007) mostraram que a suplementação de ácido *trans*-retinóico em ratos com deficiência de ferro foi eficaz na redução do excesso TfR. Estudos *in vitro* com células Caco-2 tratadas com 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ácido retinóico durante 24 ou 48h induziram a expressão do gene FPN1, que codifica a ferroportina, proteína exportadora de ferro heme da célula para o plasma. Em animais com déficit de vitamina A, houve aumento dos níveis de transcrição de hepcidina no fígado (CITELLI et al., 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas da metodologia realizada estão descritas na Figura 2:

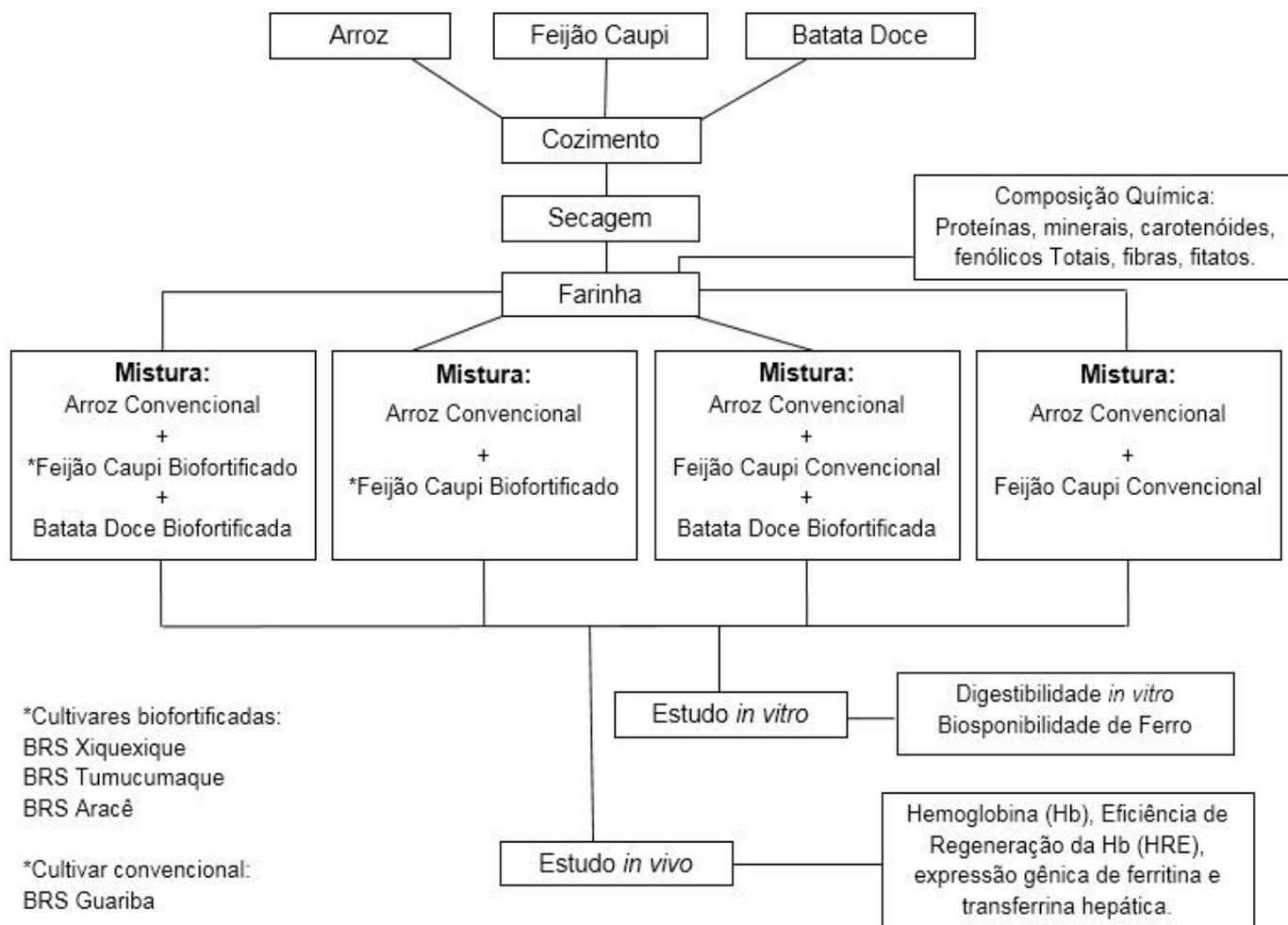


Figura 2 – Fluxograma das etapas da metodologia do presente estudo

4.1 Alimentos Teste

Foram utilizados os feijões-caupi (*Vigna unguiculata L Walp.*) cultivar BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique, biofortificados com ferro e zinco; a batata doce (*Ipomoea batatas*) cultivar Beauregard, biofortificada com provitamina A; o arroz polido BRA 02535 e o feijão caupi BRS Guariba, ambos cultivar

convencional. Todos os alimentos foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

4.2 Preparo das farinhas dos alimentos

Em todos os processos foi utilizada água deionizada, tanto para higienização e cozimento dos alimentos, quanto para limpeza dos materiais e utensílios a serem usados.

4.2.1 Arroz

Inicialmente 4 kg de arroz foram lavados e então submetidos à cocção úmida na proporção de 1:2 (arroz:água, p:v), contabilizando 20 minutos após a fervura. Posteriormente foram distribuídos em tabuleiros de alumínio, junto com a água remanescente da cocção, e secos em estufa com circulação forçada de ar, a 60°C, por 51h. O material seco foi triturado em moinho de bolas (MARCONI®) e armazenado em embalagens metálicas a 4°C. Foi feita a pesagem do arroz cru, cozido, seco e na forma de farinha.

4.2.2 Feijões

Todos os feijões foram preparados a cada 2 kg para cada cultivar. As amostras foram lavadas e cozidas em panela de pressão na proporção de 1:2 (feijão:água, p:v). Ao iniciar a pressão, foram contabilizados 15 minutos de cocção em fogo baixo. O feijão e a água remanescente foram distribuídos em tabuleiros de alumínio e secos em estufa com circulação forçada de ar a 60°C. Os feijões BRS Xique Xique e BRS Guariba secaram em 45 h, enquanto o BRS Tumucumaque e o BRS Aracê secaram em 48 h. Os feijões secos foram triturados em moinho de bolas (MARCONI®) e armazenados em embalagens metálicas a 4°C. Foi feita a pesagem dos feijões cru, cozido, seco e na forma de farinha.

4.2.3 Batata Doce

As batatas foram higienizadas com água deionizada para posterior descasque manual. Foram subdivididas em cubos pequenos e submetida a cocção úmida em panela de alumínio com água suficiente para cobrir as batatas, tampadas, no fogo baixo, durante 20 minutos. A amostra cozida e a água remanescente da cocção foram distribuídas em tabuleiros de vidro e secas em estufa com circulação forçada de ar, a 60°C, por 50h.

4.3 Misturas experimentais

A partir das farinhas das matérias-primas (feijão-caupi, batata-doce e arroz) foram obtidas oito misturas, descritas na Tabela 1, para compor as dietas do estudo *in vitro* e *in vivo*:

Tabela 1 - Misturas de alimentos biofortificados (X, T, A e BB) ou convencionais (AR, G)

Tratamentos	Sigla	Mistura
1	G	Arroz + Feijão Guariba
2	A	Arroz + Feijão Aracê
3	T	Arroz + Feijão Tumucumaque
4	X	Arroz + Feijão Xique Xique
5	GB	Arroz + Feijão Guariba + Batata Doce
6	AB	Arroz + Feijão Aracê + Batata Doce
7	TB	Arroz + Feijão Tumucumaque + Batata Doce
8	XB	Arroz + Feijão Xique Xique + Batata Doce

4.4 Determinação da composição química dos alimentos

4.4.1 Umidade

A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105°C, no qual cerca de 5g de cada amostra foi pesada e acondicionada em placas de petri para o aquecimento em estufa (BIOPAR) até peso constante, conforme o procedimento descrito pela AOAC (2012). Após secagem, as amostras foram resfriadas em

dessecador com sílica e gel e pesados em balança analítica digital, com precisão de 0,0001 g. A umidade foi calculada pela diferença entre a amostra úmida e seca.

4.4.2. Cinzas

Para análise do teor de cinzas das farinhas dos alimentos, foram pesadas cerca de 5 g das amostras em cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados, e submetidos à calcinação em mufla a 600°C, por 6 horas. Posteriormente, os cadinhos com as amostras foram resfriados em dessecador com sílica gel e novamente pesados em balança analítica digital da marca OHAUS. O teor de cinzas foi determinado pela diferença de peso antes e após a calcinação (AOAC, 2012).

4.4.3 Proteínas

O conteúdo de proteína das farinhas das amostras foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 6,25 (AOAC, 1998).

4.4.4 Minerais

O conteúdo de minerais (ferro e zinco) das farinhas foi determinado pelo método de absorção atômica, segundo AOAC (1997), utilizando o aparelho THERMO SCIENTIFIC ICE 3000 Series AA Spectrometer ®. Realizou-se a digestão das amostras (5 a 6 g) com a adição de 10 mL de ácido nítrico concentrado em aparelho de micro-ondas da marca ONE TOUCH TECHNOLOGY MARS 6/ CEM.

4.4.5 Compostos fenólicos totais

A determinação da concentração de compostos fenólicos nos alimentos foi realizada, em triplicata, utilizando-se o reagente de Folin Ciocalteu em ambiente alcalino, este reagente oxida os compostos fenólicos e reduzem o fosfomolibdato, presente no reagente, formando um composto de coloração azul com leitura em uma faixa de 720 a 765 nm, conforme descrito por Singleton *et al.* (1999).

O extrato foi preparado com 2g das farinhas dos alimentos biofortificados e convencionais adicionados de 20 mL (1:10) de solução de metanol:água (6:4), homogeneizados em agitador automático a 180rpm durante 2 horas em temperatura

ambiente. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 21°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um balão de 20ml e completado com a solução metanol:água (6:4). O extrato foi acondicionado em fresco âmbar e armazenado a -18°C até o momento da análise. Todo o processo foi realizado na ausência de luz.

Foi utilizada uma alíquota de 600µL de cada um dos extratos, adicionados de 3 mL de reagente de Folin Ciocalteu (diluído em água a 1:10) e 2,4mL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 7,5% seguido de agitação em vórtex e incubação por 1 hora em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 760 nm (BEL SP; 1000 UV) após 1 hora de repouso, ao abrigo da luz.

A quantificação do teor de compostos fenólicos totais foi efetuada utilizando curva padrão de ácido gálico por meio da equação de regressão ($y = 0,0106x - 0,0079$; $R^2 = 0,9971$) para expressar os resultados em miligramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra seca (mg GAE/100 g).

4.4.6 Fibra alimentar

Os teores de fibra alimentar total e insolúvel foram determinados pelo método enzimático-gravimétrico, segundo AOAC (1998), utilizando-se para a hidrólise enzimática a amilase termorresistente, protease e amiloglicosidase. A fibra solúvel foi determinada pela diferença entre fibra total e insolúvel.

Para a digestão das amostras, foram pesadas 1g de cada amostra e acondicionadas em um béquer, juntamente com 50 ml de tampão fosfato pH 6,0. Ajustou-se o pH para 6,0 para a posterior adição de 0,1 ml de α-amilase termorresistente. Os béqueres foram colocados em banho-maria a 97°C por 30 minutos, com agitação horizontal a cada 5 minutos. Em seguida, foram resfriados em água fria. Após resfriados, foi feito o ajuste de pH para 7,5 para a adição de 0,2 ml de protease na solução pré-digerida e os béqueres foram incubados em banho-maria à 60°C por 30 minutos com agitação horizontal constante a 100 rpm. Os béqueres foram resfriados a temperatura ambiente, o pH foi ajustado para 4,3 e foi adicionada a amiloglicosidase na solução. Novamente os béqueres foram incubados em banho-maria à 60°C por 30 minutos com agitação horizontal constante a 100

rpm.

Para a determinação da fibra alimentar insolúvel, foi feita a filtragem dos cadinhos com etanol 98% aquecido a 60°C, etanol 95% e acetona. Por fim, os cadinhos foram submetidos a secagem em estufa a 105°C *overnight* para posterior pesagem.

- Cálculo utilizado para a determinação da quantidade de fibra insolúvel da amostra:

$$\text{FAI \%} = \frac{\text{RI} - \text{P} - \text{C} - \text{BI}}{m} \times 100$$

RI = Média do resíduo insolúvel da amostra (mg)

P = Média de proteína do RI (mg)

C = Média de cinzas do RI (mg)

m = Média do peso das amostras (mg)

BI = RI_B - P_B - C_B

RI_B = Média do resíduo insolúvel do branco (mg)

P_B = Média de proteína do RI_B (mg)

C_B = RI_B de cinzas do RI_B (mg)

- Cálculo utilizado para a determinação da quantidade de fibra solúvel da amostra:

$$\text{FAS \%} = \frac{\text{RS} - \text{P} - \text{C} - \text{BS}}{m} \times 100$$

RI = Média do resíduo insolúvel da amostra (mg)

P = Média de proteína do RS (mg)

C = Média de cinzas do RS (mg)

m = Média do peso das amostras (mg)

$BI = RS_B - P_B - C_B$

RI_B = Média do resíduo solúvel do branco (mg)

P_B = Média de proteína do RS_B (mg)

C_B = RI_B de cinzas do RS_B (mg)

4.4.7 Fitatos

A quantificação de ácido fítico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Latta e Eskin (1980), utilizando um procedimento colorimétrico baseado na reação entre cloreto férrico e ácido sulfossalicílico.

Foi pesado 1g de amostra em um erlenmeyer e adicionou-se 5ml de HCl a 2,4% para posterior incubação em banho-maria a temperatura ambiente e agitação constante por 12h. As amostras contidas nos erlenmeyers foram filtradas utilizando bomba à vácuo e papel filtro de Whatman.

Para o método colorimétrico, o fitato de sódio foi utilizado como padrão. Foi feita uma solução estoque na concentração de 1 mg/mL de ácido fítico, e em seguida foram feitas as diluições nas concentrações: 100, 75, 50, 25 e 10 µg/mL, respectivamente. Foi adicionado 1 mL de reagente de Wade (0,03g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e 0,3g de ácido sulfossalicílico, diluídos em 100ml de água deionizada) em cada 3 mL da amostra ou do padrão. A leitura foi feita a 500 nm, utilizando a água deionizada como branco. Os valores foram expressos em g/100g.

4.4.8 Lipídios

Para determinação do teor de lipídios, as amostras foram submetidas a extração por solvente (éter de petróleo) a quente (Soxhlet), conforme protocolo 032/IV do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

4.4.9 Carboidratos

Os carboidratos foram calculados pela subtração dos valores de proteínas, lipídios, cinzas e umidade de 100%.

4.5 Razão molar fitato/ferro

O cálculo foi realizado por meio da divisão do valor em molar de fitato e ferro de cada amostra e dieta experimental. O peso molar do hexafosfato de mio-inositol (IP6) e do ferro é de 660g/mol e 55,85 g/mol, respectivamente. Ambos, fitato e ferro, tiveram seus valores representados em g/100g neste cálculo.

5. Planejamento Experimental

5.1 Estudo *in vitro*

5.1.1 Teor de ferro na fração digerível

A simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal das proteínas dos alimentos foi feita de acordo com o método descrito por Mejia et al., (2003). A amostra das farinhas dos alimentos (0,5 g) foram ressuspensas em água deionizada (1:20 p/v) e submetidas à digestão enzimática sequencial com pepsina [1:20 (p/p); pH 2,0] e pancreatina [1:20 (p/p); pH 7,5] em banho-maria, a 37 °C por 2 h para cada enzima. O ajuste de pH foi realizado com HCl 0,1 N e NaOH 0,1 N. A hidrólise foi interrompida pelo aquecimento a 75 °C durante 20 minutos em banho-maria. O hidrolisado foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante colhido, liofilizado por 48 h e estocado a -20 °C para análise de ferro da fração digerível.

5.1.2 Biodisponibilidade *in vitro*

5.1.3 Avaliação *in vitro* de biodisponibilidade de ferro

Foi utilizado um modelo de digestão *in vitro* com culturas de células Caco-2 para avaliar a biodisponibilidade do Fe. As dietas experimentais foram submetidas a simulação de uma digestão gástrica e intestinal. Resumidamente, a digestão

intestinal foi realizada em inserções cilíndricas fechadas no fundo por uma membrana semipermeável e colocadas em poços contendo monocamadas de células Caco-2 banhadas em meio de cultura. A câmara superior foi formada ajustando a parte inferior do anel de inserção Transwell (Corning) com uma membrana de corte molecular de 15000 Da (MWCO) (Spectra/Por 2.1, Spectrum Medical, Gardena, CA). A membrana de diálise foi mantida no lugar usando um anel de silicone (Web Seal, Rochester, NY).

A absorção de ferro pelas monocamadas de células Caco-2 foi avaliada medindo as concentrações de ferritina nas células. Foram realizadas seis repetições de cada medida de biodisponibilidade de Fe. Em termos de materiais para o estudo, as células Caco-2 foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD) na passagem 17 e utilizadas em experimentos na passagem 29. As células foram semeadas a densidades de 50.000 células/cm² em placas de 6 poços (Costar Corp, Cambridge, MA) tratadas com colágeno. A integridade da monocamada foi verificada por microscopia óptica. As células foram cultivadas a 37°C numa incubadora com 5% de CO₂ e 95% de atmosfera de ar a umidade constante, e o meio foi alterado a cada 48h.

As células foram mantidas em meio de Eagle modificado de Dulbecco mais 1% de solução antibiótica/antimicótica, 25 mmol/L de HEPES e 10% de soro bovino fetal. 48h antes do experimento, o meio de crescimento foi removido dos poços de cultura, a camada celular foi lavada e o meio de crescimento foi substituído por meio essencial mínimo (MEM) a pH 7,0. O MEM foi suplementado com 10 mmol/L de PIPES, 1% de solução antibiótica/antimicótica, hidrocortisona a 4 mg/L, insulina 5 mg/L, selênio de 5 µg/L, triiodotironina a 20 µg/L e fator de crescimento epidérmico de 20 µg/L. Este MEM enriquecido continha menos de 80 µg de Fe/L.

Todos os ingredientes e suplementos para meios de cultura de células foram obtidos de GIBCO (Rockville, MD). As células foram utilizadas no experimento de absorção de Fe aos 13 dias após a semeadura. Nestas condições, a quantidade de proteína celular medida em cada poço era altamente consistente entre os poços. No dia do experimento, 1,5 mL da amostra digerida foi adicionada à câmara superior da inserção e incubada durante 2h. Em seguida, as pastilhas foram removidas e foram

adicionados 1 mL de MEM. As culturas de células foram incubadas durante 22h a 37°C.

Foi anteriormente demonstrado que o estado do ácido ascórbico intracelular poderia influenciar a formação de ferritina (isto é, a absorção de Fe celular) e os transportadores relacionados com Fe e a expressão enzimática em células Caco-2 (TAKO & GLAHN, 2010; TAKO *et al.*, 2011; SCHEERS & SANDBERG, 2008). No presente estudo, as amostras não foram adicionadas com ácido ascórbico quando a biodisponibilidade de Fe foi testada *in vitro*.

5.1.4 Colheita de caco-2 células para análise de ferritina

Resumidamente, o meio de crescimento foi removido da cultura por aspiração e as células foram lavadas duas vezes com uma solução contendo 140 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de KCl e 10 mmol/L de PIPES a pH 7,0. As células foram colhidas adicionando uma alíquota de água deionizada e colocando-os em um sonicador (instrumentos Lab-Line, Melrose Park, IL).

As concentrações de ferritina e proteína total foram determinadas em uma alíquota da suspensão celular colhida com um estágio do ensaio imunoradiométrico (ensaio FERIRON II Ferritin, laboratórios Ramco, Houston, TX) e um ensaio colorimétrico (Bio-Rad DC Protein assay, Bio - Rad, Hercules, CA), respectivamente. Caco-2 células sintetizam ferritina em resposta a aumentos na concentração intracelular de Fe. Portanto, utilizamos a proporção de ferritina/proteína total (expressa como ng ferritina/mg de proteína) como índice da absorção de Fe celular.

5.2 Estudo *in vivo*

5.2.1 Ensaio biológico

Foram fornecidos, pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS/UFES), 72 ratos machos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação *albinus*), recém-desmamados, com peso inicial médio de 74 g. Os animais foram divididos em 9 grupos com 8 animais em cada e mantidos em gaiolas de aço inoxidável, com ciclo claro-escuro 12 h e temperatura de 23 °C.

A biodisponibilidade foi avaliada pelo método de depleção/repleção de

hemoglobina, conforme AOAC (1998). As dietas experimentais basearam-se na dieta padrão para roedores AIN-93G, segundo Reeves et al., (1993), com manipulação na quantidade de ferro.

Inicialmente os animais receberam dieta de depleção, contendo mistura de minerais isenta de ferro, por 21 dias. Após, receberam dieta de repleção contendo o mesmo teor de ferro (12 mg.kg^{-1}), ofertadas em quantidades diária controlada (*pairfed*) por 14 dias e água deionizada *ad libitum*.

Os grupos experimentais receberam as seguintes dietas:

Grupo 1: Arroz + Feijão Caupi BRS Guariba (G);

Grupo 2: Arroz + Feijão Caupi BRS Aracê (A);

Grupo 3: Feijão Caupi BRS Tumucumaque (T);

Grupo 4: Arroz + Feijão Caupi BRS Xique Xique (X);

Grupo 5: Arroz + Feijão Caupi BRS Guariba + Batata Doce Biofortificada (GB);

Grupo 6: Arroz + Feijão Caupi BRS Aracê + Batata Biofortificada (AB);

Grupo 7: Arroz + Feijão Caupi BRS Tumucumaque + Batata Biofortificada (TB);

Grupo 8: Arroz + Feijão Caupi BRS Xique Xique + Batata Biofortificada (XB);

Grupo 9: Sulfato ferroso (Grupo Controle – GC)

Foi realizada coleta de sangue pela secção da extremidade da cauda dos animais ao término das fases de depleção (21 dias) e repleção (14 dias) para a análise de hemoglobina. Ao final da fase de repleção, após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados (0,2 mL de anestésico/100 g de animal) com cloridrato de xilazina 2% (Syntec) e cloridrato de cetamina 10% (Syntec). Foram coletados 5 mL de sangue por punção cardíaca, sendo acondicionados em tubos de EDTA (VACUETTE® K3EDTA) e estes foram centrifugados por 10 minutos a 4°C e 3000G (ThermoFisher SCIENTIFIC) para a separação do plasma.

Amostras de fígado dos animais foram coletadas, lavadas em solução salina com tampão fosfato (PBS), pesadas, colocadas no nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento das análises.

Os Valores Relativos de Biodisponibilidade dos alimentos testes foram calculados considerando o padrão (sulfato ferroso) com biodisponibilidade igual a

100%.

5.2.2 Hemoglobina

Hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (AOAC, 1984), utilizando kits comerciais (Bioclin). Foram adicionados 10 µL de sangue em 2,5 mL de cianeto de hemoglobina e ferrocianeto de potássio e 250 µl da mistura foram adicionados na placa de Elisa para a leitura com intensidade de cor foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (ThermoSCIENTIFIC, Multiskan Go).

5.2.3 Eficiência na regeneração de hemoglobina (HRE)

A eficiência na regeneração de hemoglobina foi calculada utilizando a fórmula:

$HRE (\%) = [100 \times (\text{mg Fe da Hb final} - \text{mg Fe da Hb inicial})] / \text{Fe consumido}$, de acordo com (HARO-VICENTE et al., 2008), onde:

Hb final = Hemoglobina final

Hb Inicial = Hemoglobina inicial

Estima-se o teor de ferro na hemoglobina: $[\text{peso corporal (g)} \times \text{Hb (g/L)} \times 0,335 \times 6,7] / 1000$.

Essa variável foi calculada assumindo que o volume sanguíneo total é igual a 6,7% do peso corporal do rato e o ferro corporal no teor de hemoglobina como sendo 0,335g/L.

O valor biológico relativo de HRE (RBV-HRE) foi calculado da seguinte forma:

$RBV-HRE = HRE \text{ de cada animal} / \text{Média de HRE do Controle Positivo}$

5.2.4 Análise biomolecular

a) Extração de mRNA Total do fígado

Para a extração do mRNA total e dosagens de proteínas no fígado

(LABIOCEL, 2002; MARTIGNONI et al., 2006; SUENAGA et al., 2013; DOI et al., 2009), foram coletadas fatias de aproximadamente 8-10 mm e no máximo de 3 mm de espessura (ou 30 mg) da parte média do fígado.

O órgão foi macerado em nitrogênio líquido em gral mortalha livre de RNase e as amostras alíquotadas para extração do RNA. O RNA total do intestino delgado foi extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme as recomendações do fabricante. Após extração, as amostras de RNA foram tratadas com DNase (RQ1 RNase Free-DNase Kit; Promega, Madison, WI, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O RNA foi extraído novamente com reagente TRIzol, quantificado a 260 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 UV-Visible, Pharmacia Biotech), e o grau de pureza determinado pela razão de densidade óptica 260/280nm.

b) *Determinação da expressão gênica de ferritina e transferrina.*

A expressão dos níveis de mRNA no fígado de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro foram analisados por RT-PCR. Os marcadores compreendiam o SYBR Green, PCR mastermix da Applied Biosystems (Foster City, CA) e as análises foram realizadas no equipamento ABI Prism 5700 Sequence Detection System, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green e o software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA). A RT-PCR envolveu um ciclo de desnaturação inicial de 95°C (10 minutos) e, em seguida, 40 ciclos com 1 minuto de desnaturação (94°C), 1 minuto de anelamento (56°C) e 2 minutos de alongamento (72°C), seguido por uma curva padrão de dissociação. Sequências de primers (Choma Biotechnologies) senso e anti-senso foram previamente avaliados para a formação de dímeros e foram usados (SONNWEBER *et al.*, 2012) para amplificar as proteínas ferritina e transferrina no fígado. A expressão relativa dos níveis de mRNA foram normalizadas pelo controle endógeno gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) para ratos. Todas as etapas ocorreram em condições livre de RNase.

6 Análise Estatística dos Dados

Os 9 grupos (n = 8) foram comparados usando análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), assim como a análise bromatológica das farinhas das amostras. A análise estatística foi feita com o programa SPSS Statistics Data Editor versão 19.0 (IBM SPSS Statistics Base, DMSS, SP, Brasil).

7 Aspectos Éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), protocolo nº72/2016.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A farinha do feijão BRS Guariba apresentou maior ($p < 0,05$) conteúdo de proteínas, seguido das farinhas dos feijões BRS Aracê e Tumucumaque, que não diferiram entre si ($p \geq 0,05$) e o feijão BRS Xique Xique ($p < 0,05$). O arroz Chorinho e a batata doce Beauregard, em ordem decrescente, compreenderam o menor teor protéico e foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Composição nutricional das farinhas das amostras em base seca.

	Arroz Chorinho	Caupi BRS Guariba	Caupi BRS Aracê	Caupi BRS Tumucumaque	Caupi BRS XiqueXique	Batata Doce Beauregard
Umidade (g/100)	5,59 ^c ±0,13	2,08 ^a ±0,35	3,21 ^b ±0,39	5,3 ^c ±0,19	7,72 ^d ±0,15	12,15 ^e ±0,02
Cinzas (g/100)	0,36 ^a ±0,01	3,79 ^d ±0,01	4,19 ^e ±0,02	3,7 ^{cd} ±0,02	3,69 ^c ±0,02	3,49 ^b ±0,07
Lipídeos (g/100)	0,58 ^a ±0,16	1,57 ^c ±0,06	1,91 ^{cd} ±0,18	1,95 ^d ±0,09	1,97 ^d ±0,13	0,94 ^b ±0,10
Proteína (g/100)	10,34 ^b ±0,45	30,05 ^e ±0,10	27,86 ^d ±0,50	27,64 ^d ±0,69	24,96 ^c ±0,12	5,77 ^a ±0,16
Fibra Alimentar Total (g/100)	6,49	35,9	23,36	43,05	25,69	19,89
<i>Fibra Solúvel</i>	2,28	3,32	4,74	25,57	7,45	8,54
<i>Fibra Insolúvel</i>	4,21	32,58	18,62	17,48	18,24	11,34
Carboidratos (g/100)	83,13 ^c ±0,49	62,51 ^{ab} ±0,29	62,83 ^{ab} ±0,79	61,40 ^a ±0,81	69,98 ^{abc} ±0,04	77,66 ^{bc} ±0,05
Fenólicos Totais (mg de EqAG/g)	0,26 ^a ±0,18	1,01 ^b ±0,04	0,91 ^b ±0,03	1,02 ^b ±0,09	1,09 ^b ±0,09	1,53 ^c ±0,03
Ácido Fítico (g/100g)	1,37 ^a ±0,02	1,82 ^b ±0,03	1,79 ^{ab} ±0,05	1,8 ^b ±0,03	1,75 ^{ab} ±0,02	1,59 ^{ab} ±0,02
Minerais						
Ferro (mg/100g)	0,0 ^a ±0,58	6,67 ^d ±0,28	5,78 ^c ±0,23	6,35 ^{cd} ±0,04	6,69 ^d ±0,01	1,60 ^b ±0,50
Zinco (mg/100g)	1,69 ^b ±0,02	4,38 ^c ±0,02	4,51 ^c ±0,11	4,39 ^c ±0,03	4,63 ^c ±0,13	0,33 ^a ±0,12
Razão Molar						
Fitato/ferro	0,0	22,87	26,36	23,96	22,0	82,85

Dados apresentados em média e desvio-padrão. Médias nas linhas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). N=3.

Com relação às cinzas, o maior valor foi observado para a farinha do feijão BRS Aracê ($p < 0,05$). O feijão caupi BRS Guariba não apresentou diferença significativa comparado ao BRS Tumucumaque, mas exibiu maior valor comparado ao BRS Xique Xique, o arroz Chorinho e a batata doce Beauregard ($p < 0,05$). O

feijão caupi BRS Xique Xique também mostrou equivalência estatística ao BRS Tumucumaque, entretanto, foi superior ao arroz e a batata ($p < 0,05$). Esta por sua vez, evidenciou maior teor de cinzas comparada ao arroz, que foi a amostra com o menor valor entre todos ($p < 0,05$).

De acordo com a análise de lipídeos, a farinha dos feijões BRS Aracê, Tumucumaque e Xique Xique não diferiram entre si ($p \geq 0,05$) e o feijão BRS Aracê não apresentou diferença significativa do feijão BRS Guariba ($p \geq 0,05$). Os menores valores foram encontrados para a batata doce Beauregard e o arroz Chorinho, respectivamente.

A farinha da batata doce Beauregard apresentou a maior concentração de fenólicos totais ($p < 0,05$) em relação as outras farinhas. Os feijões não diferiram entre si ($p \geq 0,05$) e o arroz foi o menor valor observado dentre todos ($p < 0,05$).

O conteúdo de ácido fítico foi semelhante entre os quatro tipos de feijão e a batata ($p \geq 0,05$). O arroz exibiu menor teor de fitatos ($p < 0,05$), entretanto, não houve diferença estatística comparado ao feijão caupi BRS Aracê, BRS Xique Xique e a batata doce ($p \geq 0,05$).

Foram analisados os teores dos minerais ferro e zinco. O teor de ferro foi semelhante entre os feijões caupi BRS Guariba, Xique Xique e Tumucumaque ($p < 0,05$). Este por sua vez, também apresentou semelhança ao BRS Aracê ($p < 0,05$). A menor média para o conteúdo de ferro foi observada na batata doce, enquanto o arroz não apresentou este mineral em sua composição. Quanto ao zinco, as amostras de feijão apresentaram teores semelhantes entre si ($p < 0,05$), valores maiores do que a batata doce e o arroz, enquanto este exibiu valores superiores comparado aquele ($p < 0,05$).

Quanto a razão molar fitato/ferro dos feijões caupi, o BRS Aracê exibiu maior valor. A batata doce Beauregard foi a amostra com maior valor para a razão molar de fitato/ferro.

Após o preparo (**Tabela 3**), as dietas experimentais apresentaram os teores de ferro e zinco (**Tabela 4**) razão molar fitato/ferro (**Tabela 5**) representados abaixo:

Tabela 3 - Composição das dietas experimentais (g/kg).

Ingredientes/Dieta	Depleção	Repleção								
		Sulfato Ferroso (GC)	PRESENÇA DE BATATA BIOFORTIFICADA				AUSÊNCIA DE BATATA BIOFORTIFICADA			
			Mistura 1 (Guariba)	Mistura 2 (Aracê)	Mistura 3 (Tumucumaque)	Mistura 4 (XiqueXique)	Mistura 5 (Guariba)	Mistura 6 (Aracê)	Mistura 7 (Tumucumaque)	Mistura 8 (XiqueXique)
Feijão Teste ¹	-	-	164,8	188,08	172,68	164,43	179,81	207,71	189,11	179,28
Batata Doce ¹			62,2	71	65,23	62,12	-	-	-	-
Arroz Convencional			139,16	158,73	145,75	138,78	139,16	158,73	145,75	138,78
Albumina ²	200	200	86,99	77,68	89,02	99,66	42,09	39,86	42,62	45,11
Maltodextrina	132	132	132	85,35	120,48	132	58,92	58,92	58,92	58,92
Sacarose	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Óleo de Soja	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Celulose ³	50	50	43,10	42,13	42,77	43,12	44,18	43,31	43,88	44,19
Mix de Minerais s/ Ferro	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Mix de Vitaminas	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
L-cistina	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Bitartarato de Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido de milho ⁴	397,5	397,5	151,25	156,53	143,57	139,39	315,29	270,93	299,18	313,19
Sulfato Ferroso (mg /kg)	-	59,57	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ Quantidade suficiente para fornecer 12 mg Fe/kg de dieta

² Quantidade suficiente para fornecer 180 g proteína/kg de dieta

³ Quantidade suficiente para fornecer 50 g/kg de dieta

⁴ Quantidade suficiente para fornecer 1 kg de dieta

Tabela 4: Razão Molar Fitato/Ferro das Dietas Experimentais

Tratamentos	Fitato/Ferro
G	38,80
A	44,53
T	40,65
X	37,89
GB	43,79
AB	49,88
TB	45,77
XB	42,93

G: arroz + BRS Guariba; A: arroz + BRS Aracê; T: arroz + BRS Tumucumaque; X: arroz + BRS XiqueXique; GB: arroz + BRS Guariba + batata doce; AB: arroz + BRS Aracê + batata doce; TB: arroz + BRS Tumucumaque + batata doce; XB: arroz + BRS XiqueXique + batata doce;

As dietas experimentais, conforme a Tabela 4, exibiram maiores valores numéricos para a razão molar fitato/ferro nas misturas adicionadas de batata doce quando comparadas às que não continham esta fonte de carotenoides.

A principal forma de armazenamento de fósforo em cereais e leguminosas é o fitato. Refere-se ao ácido fítico (hexafosfato de mio-inositol), constituído por um anel de inositol com seis grupos éster fosfato e sais. Este composto se liga a íons metálicos, como o ferro e o zinco, formando complexos insolúveis no trato gastrointestinal e por isso não são absorvidos em seres humanos devido à ausência de enzimas fitostáticas intestinais (GIBSON *et al.*, 2010).

O efeito inibitório do ácido fítico na absorção de ferro é dependente da dose e ocorre mesmo em concentrações muito baixas de fitato (GIBSON *et al.*, 2010). De acordo com HURRELL (2004), o fitato deve ser reduzido para que a relação molar de fitato:ferro seja inferior a 1: 1. Nesse nível, espera-se que a absorção de ferro aumente duas vezes, assim como a absorção de zinco em adultos. Estudos em humanos e *in vitro* mostraram que a razão molar de fitato:ferro de 4:1 a 30:1 poderia inibir significativamente a absorção de ferro (ANTON *et al.*, 2008; ARIZA-NETO *et al.*, 2007; HURRELL *et al.*, 1992; PETRY *et al.*, 2013). No presente estudo, a razão molar fitato/ferro foi consideravelmente superior em todas as amostras analisadas com valores acima de 26:1.

Os ratos têm a enzima fitase intestinal, mas estudos mostram que nos animais jovens, como os deste estudo, têm baixa atividade dessa enzima (LA FRANO *et al.*, 2014). Desta maneira, é possível que a interação fitato-ferro tenha reduzido a disponibilidade deste mineral para a absorção e conseqüente

biodisponibilidade. Os grupos com maior razão molar fitato/ferro (A e T) apresentaram menor digestibilidade *in vitro*. Os grupos com menor razão molar (G e X) apresentaram maior digestibilidade, entretanto, ao serem associados à batata doce, exibiram baixa biodisponibilidade *in vitro*. Este resultado se torna compreensível ao avaliar a razão molar fitato/ferro das dietas experimentais (Tabela 4), nas quais percebe-se foram observados altos valores para as combinações que continham a batata doce.

Tabela 5: Teor de ferro e zinco das dietas experimentais (mg/kg)

Dietas Experimentais	Teor de Fe mg/kg	Teor de Zn mg/kg
G	12,43	25,54
A	13,77	25,08
T	14,28	24,66
X	11,63	23,67
GB	11,58	25,33
AB	13,73	19,65
TB	12,15	18,83
XB	11,59	16,84
SF	1,87	15,41

G: arroz + BRS Guariba; A: arroz + BRS Aracê; T: arroz + BRS Tumucumaque; X: arroz + BRS XiqueXique; GB: arroz + BRS Guariba + batata doce; AB: arroz + BRS Aracê + batata doce; TB: arroz + BRS Tumucumaque + batata doce; XB: arroz + BRS XiqueXique + batata doce;

Não foi observada diferença significativa no consumo alimentar total, ganho de peso total, concentração de hemoglobina (inicial e final) e o ganho da mesma entre os grupos ($p \geq 0,05$), conforme descrito na **Tabela 6**.

Tabela 6: Ingestão alimentar total, ganho de peso total (GP total) e ingestão de ferro dos animais (estudo *in vivo*).

	Ingestão Alimentar (g)*	GP Total (g)*	Ingestão de Ferro (mg)
SF	229,01±26,82	51,2±15,87	0,43 ^a ±0,05
G	244,28±20,32	56,35±9,61	3,04 ^{bcd} ±0,25
A	237,56±22,98	50,95±8,99	3,27 ^{cd} ±0,32
T	234,78±19,22	53,38±13,00	3,35 ^d ±0,27
X	237,65±32,07	49,18±10,21	2,76 ^b ±0,37
GB	241,04±29,39	53,75±7,69	2,79 ^b ±0,34
AB	233,25±24,85	45,7±15,97	3,20 ^{bcd} ±0,34
TB	246,6±22,74	45,68±32,44	3,00 ^{bcd} ±0,28
XB	244,6±9,16	56,85±10,70	2,83 ^{bc} ±0,11

Dados apresentados em média e desvio-padrão. SF: sulfato ferroso; GB: arroz + BRS Guariba + batata doce; AB: arroz + BRS Aracê + batata doce; TB: arroz + BRS Tumucumaque + batata doce; XB: arroz + BRS XiqueXique + batata doce; G: arroz + BRS Guariba; A: arroz + BRS Aracê; T: arroz + BRS Tumucumaque; X: arroz + BRS XiqueXique. Médias nas colunas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). N=8. *ns = não significativo.

Com relação ao HRE (Tabela 7) todas as combinações alimentares com batata doce (GB, AB, XB e TB) foram similares às suas contrapartes sem batata doce ($p < 0,05$), ao grupo Xique Xique (X) e entre si ($p < 0,05$). Os grupos AB e XB não diferiram dos grupos T e A, respectivamente ($p \geq 0,05$). Sobre os grupos sem a adição da batata doce (G, A, X e T), o grupo Aracê foi semelhante ao Tumucumaque, o Xique Xique ao Guariba e este foi estatisticamente igual a todos os outros (A, X, T) ($p < 0,05$).

Sobre os grupos teste, o GB se destacou no percentual de HRE (59,65%) (Tabela 7), seguido pelo grupo T ($p < 0,05$). Estes dois grupos diferiram entre si ($p < 0,05$), mas foram semelhantes ao demais grupos experimentais ($p < 0,05$).

Tabela 7: Concentração de hemoglobina, Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE) e Valor Biológico Relativo de HRE (RBV – HRE).

	Hb Inicial* (g/dL)	Hb Final* (g/dL)	Ganho de Hb* (g/dL)	HRE %	RBV-HRE
G	6,97±0,80	8,45±0,92	1,48±0,84	51,00 ^{ab} ±8,49	0,25±0,15
A	6,98±0,79	8,50±0,92	1,52±1,28	46,58 ^{ab} ±8,06	0,22±0,09
T	6,98±0,81	8,69±0,87	1,71±0,91	40,50 ^a ±11,38	0,21±0,16
X	6,99±0,76	8,68±0,64	1,69±0,93	58,50 ^{ab} ±8,01	0,30±0,19
GB	6,97±0,85	8,76±0,58	1,79±0,63	59,65 ^b ±13,93	0,31±0,22
AB	6,95±0,82	9,00±0,94	2,05±0,87	49,04 ^{ab} ±13,13	0,25±0,16
TB	6,96±0,80	9,21±0,93	2,26±0,84	54,92 ^{ab} ±15,18	0,28±0,18
XB	6,97±0,80	8,00±0,56	1,62±0,35	55,17 ^{ab} ±14,72	0,29±0,23

Dados apresentados em média e desvio-padrão. SF: sulfato ferroso; GB: arroz + BRS Guariba + batata doce; AB: arroz + BRS Aracê + batata doce; TB: arroz + BRS Tumucumaque + batata doce; XB: arroz + BRS XiqueXique + batata doce; G: arroz + BRS Guariba; A: arroz + BRS Aracê; T: arroz + BRS Tumucumaque; X: arroz + BRS XiqueXique. Médias nas colunas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). N=8. *ns = não significativo.

Os grupos experimentais adicionados de batata doce apresentaram ingestão de ferro semelhante entre si e quando comparados às suas contrapartes sem a batata (**Tabela 6**). Somado a isso, o ganho de hemoglobina destes grupos foi similar quando comparado ao grupo controle (SF). Entretanto, a eficiência na regeneração de hemoglobina foi menor para os grupos teste em relação ao sulfato ferroso, evidenciando a menor quantidade de ferro biodisponível nas dietas experimentais citadas. O mesmo foi observado no estudo de Gomes e colaboradores (2017), em que não houve diferença no ganho de hemoglobina e HRE% em animais alimentados com sorgo na ausência e presença de batata doce biofortificada.

A ingestão de ferro pelo grupo Xique Xique (X) na fase de repleção foi a menor observada e pode ter levado ao aumento na expressão de transferrina no tecido hepático como forma de compensar a redução de suprimento deste mineral. O aumento deste transportador pode explicar o maior transporte de ferro para o fígado, aumentando a expressão gênica de ferritina (valores próximos ao controle) e reduzindo a disponibilidade de ferro para a hematopoiese, resultado observado nos níveis de ganho de hemoglobina dos animais. Embora não tenham apresentado significância estatística, os animais que receberam as misturas com batata doce exibiram menor expressão de ferritina comparados aos grupos sem a adição da fonte de carotenóides, possivelmente devido ao menor suprimento de ferro biodisponível nestas dietas.

Em contrapartida, os grupos A e X, ambos sem a presença do β -caroteno na mistura, apresentaram maiores níveis de ferritina. Sabe-se que a hepcidina, peptídeo central na regulação sistêmica de ferro, têm seus níveis de mRNA modulados pela vitamina A. Em baixas concentrações deste hormônio, há bloqueio da ferroportina nos enterócitos, afetando a absorção de ferro, e nos macrófagos e hepatócitos, inibindo a mobilização de ferro dos estoques de ferritina deste último (CUNHA, 2013; VYORAL & PETRAK, 2017).

Embora o ganho de hemoglobina tenha sido semelhante em todos os grupos, inclusive no controle positivo, este apresentou maior eficiência de regeneração da hemoglobina. O feijão convencional exibiu maior percentual comparado a todos os grupos teste e, dentre os feijões biofortificados, o Tumucumaque recebeu destaque, mas ainda inferior à sua contraparte convencional. Apesar da similaridade na ingestão de ferro e ganho de hemoglobina, os feijões citados diferiram no índice de biodisponibilidade *in vivo* e, os demais grupos, embora com resultados semelhantes, apresentaram valores maiores que 50%, em sua maioria. Isto vai ao encontro do exposto por Cunha (2013) e Garcia *et al* (2013), segundo os quais na presença de anemia, ocorrem modificações fisiológicas responsáveis por alterar alguns estímulos no mecanismo intestinal de absorção de Fe, como o aumento da expressão de DMT1 e TfR1, tornando o Fe dietético mais biodisponível e aumentando a utilização deste para a síntese de Hb.

O termo "biodisponibilidade" é definido como a proporção de um nutriente ingerido em alimentos que é absorvido e utilizado por meio de caminhos metabólicos normais, sofrendo influências de fatores dietéticos e do indivíduo (HURREL, 2002; SOUZA, 2005). Estudos evidenciam o aumento da biodisponibilidade de ferro em alimentos biofortificados, como o feijão (TAKO, BLAIR, GLAHN, 2011; HAAS *et al.*, 2005; TAKO *et al.*, 2013; PETRY *et al.*, 2012).

A fim de verificar a concentração de ferro disponível para ser absorvido após sua passagem pelo trato gastrointestinal, avaliou-se o teor de ferro da fração digerível das amostras experimentais de forma isolada (**Tabela 8**). O feijão BRS Xique Xique apresentou o maior conteúdo de ferro disponível e foi similar aos valores encontrados para a batata doce biofortificada e o feijão BRS Guariba ($p < 0,05$). Os menores valores foram observados no feijão BRS Aracê e Tumucumaque, ambos não apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$).

Todavia, estes se assemelharam ao feijão BRS Guariba e a batata doce, mas não ao Xique Xique ($p < 0,05$).

Tabela 8: Resultados das análises *in vitro* e expressão gênica de ferritina e transferrina.

	Teor de ferro da fração digerível (mg)	Biodisponibilidade de ferro <i>in vitro</i> ¹ (ferritina/proteína)	Expressão Gênica (<i>in vitro</i>)	
			Ferritina	Transferrina
SF	-	77,87 ^d ±5,82	1,00±0,00	1,00 ^b ±0,00
G	25,77 ^{bc} ±1,71	5,71 ^{bc} ±0,32	0,39±0,11	0,17 ^a ±0,12
A	18,23 ^{ab} ±1,61	5,00 ^{bc} ±0,31	1,37±0,74	0,06 ^a ±0,02
T	17,04 ^{ab} ±2,90	5,73 ^{bc} ±0,75	1,12±1,04	0,34 ^a ±0,39
X	30,46 ^c ±8,58	6,53 ^c ±1,08	1,14±0,95	1,36 ^b ±0,54
BB	24,5 ^{bc} ±2,51	-	-	-
GB	-	4,38 ^{abc} ±0,99	1,75±0,96	0,17 ^a ±0,11
AB	-	3,72 ^{ab} ±1,59	0,35±0,32	0,06 ^a ±0,02
TB	-	4,08 ^{ab} ±0,50	2,00±1,80	0,08 ^a ±0,03
XB	-	2,16 ^a ±0,35	0,46±0,20	0,09 ^a ±0,03

Dados apresentados em média e desvio-padrão. SF: sulfato ferroso; GB: arroz + BRS Guariba + batata doce; AB: arroz + BRS Aracê + batata doce; TB: arroz + BRS Tumucumaque + batata doce; XB: arroz + BRS XiqueXique + batata doce; G: arroz + BRS Guariba; A: arroz + BRS Aracê; T: arroz + BRS Tumucumaque; X: arroz + BRS XiqueXique; BB: batata doce biofortificada. Médias nas colunas seguidas por diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). N=3.

A análise de biodisponibilidade *in vitro* revelou maior média pra o grupo controle (SF) ($p < 0,05$). Os grupos adicionados de batata doce (AB, XB, TB, GB) não diferiram entre si, resultado este também observado para as misturas sem a adição da batata (A, X, T, G) ($p < 0,05$). O grupo Xique Xique (X) foi o único que diferiu da sua contraparte adicionada de batata doce, apresentando valores menores quando adicionado da mesma ($p < 0,05$). Outrossim, sugere-se que a maior biodisponibilidade de ferro do feijão Xique Xique tenha ocorrido em virtude da maior digestibilidade observada do mesmo.

Os grupos A, T e G na biodisponibilidade *in vitro* foram similares à todas as misturas adicionadas de batata doce, com exceção do Xique Xique (XB), que se assemelhou apenas aos grupos com adição da batata doce ($p < 0,05$). A mistura X foi similar apenas ao grupo GB ($p < 0,05$). O grupo contendo feijão caupi convencional (G) apresentou similaridade estatística aos grupos com feijão caupi biofortificado Aracê (A), Xique Xique (X) e Tumucumaque (T) ($p < 0,05$).

No que concerne a expressão gênica, não foi observada diferença estatística entre os grupos para os níveis de ferritina hepática. No entanto, entre as médias de transferrina, observou-se similaridade entre o grupo controle (SF) e o grupo Xique Xique (X) ($p < 0,05$), reafirmando a maior biodisponibilidade de ferro desta amostra. Os demais grupos experimentais não diferiram entre si ($p < 0,05$).

A combinação de alimentos biofortificados com carotenoides e os feijões convencional e biofortificado com ferro e zinco não foi o suficiente para favorecer a absorção de ferro, visto que a biodisponibilidade *in vitro* destas misturas foi menor comparada aos grupos que não receberam a batata doce como fonte de β -caroteno. A literatura mostra que a vitamina A pode se ligar ao ferro e formar um complexo que atua como agente quelante, evitando o efeito inibitório dos fitatos na absorção de ferro (GARCIA-CASAL & LARYSSE, 1998). Todavia, para ser convertido na sua forma ativa, o β -caroteno precisa sofrer a ação da enzima retinal redutase, dependente de zinco (COZZOLINO, 2016). Logo, a vitamina A pode auxiliar no efeito negativo dos fitatos, mas ser afetada pela concentração de zinco.

Acredita-se que combinação de alimentos básicos característicos do hábito alimentar no Brasil, como arroz e feijão, associado a vegetais biofortificados com carotenoides, como a batata doce, pode aumentar a biodisponibilidade do ferro. É conhecida a ação da vitamina A sobre a mobilização de ferro de estoques hepáticos, favorecendo a disponibilidade deste mineral para hematopoiese e síntese de hemoglobina (SEMBA & BLOEM, 2002). Ademais, esta vitamina A tem sido associada à expressão gênica da hepcidina no fígado, hormônio que regula a absorção e a exportação de ferro endógeno por meio do receptor ferroportina (OATES, 2007).

Existe a premissa de que a mistura desses alimentos na dieta pode aumentar a biodisponibilidade de ferro e potencializadores compostos da absorção do mesmo e minimizar o efeito negativo dos fitoquímicos (DIAS *et al*, 2015). Não obstante, este estudo não apresentou resultados favoráveis à combinação desses alimentos.

Ao discorrer sobre a biodisponibilidade de certos micronutrientes, deve-se considerar a influência da matriz alimentar e os efeitos potenciadores e inibidores dietéticos no processo absorptivo. A vitamina A compreende os compostos com atividade biológica do retinol. Os alimentos de origem animal fornecem a fonte de vitamina A pré-formada, enquanto os alimentos vegetais são constituídos das formas carotenóides da provitamina A e precisam ser convertidos em vitamina A no intestino.

Esta conversão é influenciada por fatores que incluem a matriz de alimentos, espécies de provitamina, preparação de alimentos e o teor de gordura da refeição como um todo (CASGRAN *et al.*, 2010). Assim, a simples presença de carotenoides em um alimento não é a garantia de que esses estarão disponíveis para a absorção e conversão em retinol.

Tako e colaboradores (2011) mostraram que feijões coloridos biofortificados exibiram maior biodisponibilidade de ferro comparado às amostras convencionais no ensaio *in vivo* e *in vitro*. Diferentes resultados foram observados no presente estudo, os resultados *in vivo* usando ratos mostraram biodisponibilidade de Fe semelhante ao sulfato ferroso e *in vitro* isso não foi observado. No presente estudo, os resultados *in vivo* não suportam as observações analisadas *in vitro* acerca da biodisponibilidade. Ainda, todos os feijões biofortificados avaliados não diferiram do feijão convencional nos índices de biodisponibilidade, isto é, para os resultados de biodisponibilidade e digestibilidade *in vitro* e HRE.

Pachón e colaboradores (2009) não observaram diferença para o ferro dialisável em feijões biofortificados e sua contraparte convencional, por outro lado, ambos apresentaram alta biodisponibilidade no modelo animal. Neste estudo, o grupo que recebeu feijão BRS Aracê (A) apresentou menor digestibilidade *in vitro* e expressão gênica de ferritina e transferrina na presença de batata doce. É importante ressaltar uma possível competição entre o ferro e zinco pelo mesmo sítio, em alimentos biofortificados com estes minerais, decorrente de sua similaridade química, afetando a disponibilidade de ferro para absorção junto a menor conversão de β -caroteno em vitamina A como resultado da menor presença de cofator enzimático para a retinal redutase (COZZOLINO, 1997; PEDROSA & COZZOLINO, 1993). É conhecida a modulação da vitamina A na expressão gênica em nível pós-transcricional das proteínas do metabolismo de ferro.

Compostos fenólicos são componentes originados do metabolismo secundário das plantas, essenciais para o seu crescimento e reprodução, e por isso estão amplamente distribuídos em diversos alimentos vegetais. Possuem em sua composição química um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (MALACRIDA; MOTTA, 2005).

Salvo sua atividade antioxidante, os fenólicos são conhecidos como fatores antinutricionais capazes de reduzir a utilização orgânica de alguns nutrientes (SOUZA

2005). A batata doce do presente estudo apresentou maior concentração de fenólicos totais (1,53 mg de EqAG/g) comparada a todas as outras amostras teste utilizadas (**Tabela 2**), podendo este componente, além dos fitatos, ter afetado a biodisponibilidade de minerais dos feijões teste, uma vez que os grupos experimentais que receberam a batata doce apresentaram biodisponibilidade de ferro *in vitro* inferior aos que não receberam a fonte de carotenoides. Contudo, Dias e colaboradores (2015) relataram maior biodisponibilidade de ferro em animais que receberam feijão caupi adicionado de batata doce ou abóbora biofortificada com pró-vitamina A (127,11 mg de β -caroteno/100g de amostra), mas com baixo teor de ácido fítico (0,10 mg/100g) e razão molar fitato/ferro comparado aos valores encontrados no presente estudo (Tabela 1), o que nos permite reafirmar a interação negativa dos fatores antinutricionais sobre a biodisponibilidade de minerais.

9. CONCLUSÃO

A combinação de alimentos biofortificados com ferro e zinco junto a alimentos com alto teor de carotenoides provitamina A não aumentou a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, conforme o propósito de favorecer a biodisponibilidade deste mineral. Não foi possível observar diferença entre os tratamentos no que concerne ao estudo *in vivo*, ainda assim, houve maior expressão do mRNA para ferritina no grupo Xique Xique.

De acordo com os resultados deste estudo, o feijão caupi BRS Xique Xique se mostrou o mais promissor comparado às outras cultivares, exibindo maior teor de ferro na fração digerível, melhor biodisponibilidade de ferro *in vitro* e expressão gênica de transferrina. Não obstante, é interessante avaliar a interação de fatores inibidores e potencializadores da biodisponibilidade de ferro presentes nos alimentos como etapa preliminar às possíveis misturas dos mesmos, visto que o alto teor de fitato encontrado na batata doce biofortificada pode ter influenciado negativamente ou contraposto o possível efeito benéfico do beta-caroteno na biodisponibilidade de ferro do feijão caupi.

10. REFERÊNCIAS

ABRAMOWSKI, S. W.; WAEBER, G.; GASSNER, C.; BUSER, A.; FREY, B. M.; FAVRAT, B.; TISSOT, J. D. Physiology of Iron Metabolism. **Transfusion Medicine and Hemoteraphy**, v. 41, p. 213-221, 2014.

ALVES, R. M. V; ITO, D; CARVALHO, J. L. V; MELO, W; F; GODOY, R. L. O. Stability of biofortified sweet potato flour. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 59-71, 2012.

AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Rev. Nutr.** 19(2):233-243, 2006.

AMENY, M. A.; RAILA, J.; WALZEL E.; SCHWEIGERT, F. J. Effect of iron and/or vitamin A re-supplementation on vitamin A and iron status of rats after a dietary deficiency of both components. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v.16, p.175-178, 2002.

ANDERSON, G.J.; VULPE, C. D. Mammalian iron transport. **Cell. Mol. Life Sci.** 66:3241-3261, 2009.

ANTON, A. A.; ROSS, K. A.; BETA, T.; FULCHER, R. G.; ARNTFIELD, S. D. Effect of dehulling treatments on some nutritional and physical properties of navy and pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **LWT- Food Sci. Tech.** v.41(5), 771-778, 2008.

ARIZA-NIETO, M.; BLAIR, M. W.; WELCH, R. M.; GLAHN, R. P. Screening of iron bioavailability patterns in eight bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes using the Caco-2 cell in vitro model. **J. Ag. Food Chem.** v.55(19), 7950-795, 2007.

ARRUDA, S.F.; SIQUEIRA, E.M.A.; VALÊNCIA, F.F. Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress by iron tissues overload. **Nutrition**. v.25, p.472-478, 2009.

BARROS, N. V. A; LEAL, M. J. B; ARAÚJO, M. A. M; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R.

CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI. Recife. Composição química de cultivares biofortificadas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Teresina: Universidade Federal do Piauí, 2013. 5 p.

BOGDAN, A. R.; MIYAZAWA, M.; HASHIMOTO, K.; TSUJI, Y. Regulators of Iron Homeostasis: New players in Metabolism, Cell Death, and Disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v.41, n.3, p.274-286, 2016.

BOUIS, H. E; HOTZ, C; MCCLAFFERTY, B; MEENAKSHI, J. V; PFEIFFER, W. H. Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 31-40, 2011.

CAMASCHELLA, A.; PAGANI, A.; NAI, A.; SILVESTRI, L. The mutual control of iron and erythropoiesis. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, p. 20-26, 2016.

CASGRAIN, A.; COLLINGS, R., HARVEY, L. J.; BOZA, J. J.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Micronutrient bioavailability research priorities. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 91, p.1423-1429, 2010.

CAVALCANTE, R. B. M; MORGANO, M. A; SILVA, K. J. D; ROCHA, M. M; ARAÚJO, M. A. M; ARAÚJO, R. S. R. Cheese bread enriched with biofortified cowpea flour. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 1, p. 97-103, 2016.

CITELLI, M; BITTENCOURT, L. L; SILVA, S. V; PIERUCCI, A. P. T; PEDROSA, C. Vitamin A modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. **Biological Trace Element Research**, v. 149, p.64-70, 2012

CHUNG, J.; WESSLING-RESNICK, M. Molecular Mechanisms and Regulation of Iron Transport. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 40, n. 2, p.151-182, 2003.

COZZOLINO, S. M. F. **Mineral bioavailability**. R. Nutr. Campinas, 10(2): 87-98, 1997.

COZZOLINO, S. M. F. **BIODISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES**. 5 Edição. Manole,

2016.

CUNHA, M. S. B. **A deficiência de vitamina A modula o metabolismo de ferro via eritropoiese ineficaz de forma independente da resposta inflamatória**. 2013. Dissertação de Mestrado em Nutrição Humana – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

DETIVAUD, L.; NEMETH, E.; BOUDJEMA, K.; TURLIN, B.; TROADEC, M. B.; LEROYER, P.; ROPERT, M.; JACQUELINET, S.; COURSELAUD, B.; GANZ, T.; BRISSOT, P.; LOREAL, O. Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function. **Blood Journal**, v. 106, n 7, p. 746-748, 2005.

DIAS, D.M.; MOREIRA, C. M. E.; GOMES, M. J.; TOLEDO, L. R. C.; NUTTI, M. R.; SANTANA, P. H. M.; MARTINO, H. S. Rice and Bean Targets for Biofortification Combined with High Carotenoid Content Crops Regulate Transcriptional Mechanisms Increasing Iron Bioavailability. *Nutrients*, n.7(11), 2015.

DONOVAN, A.; LIMA, C. A.; PINKUS, J. L.; PINKUS, G. S.; ZON, L. I.; ROBINE, S.; ANDREWS, N. C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. **Cell Metabolism**, v.1 2005.

DU, F.; QIAN, Z.M.; GONG, Q.; ZHU, Z.J.; LU, L.; KE, Y. The iron regulatory hormone hepcidin inhibits expression of iron release as well as iron uptake proteins in J774 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 23:1694-1700, 2012.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produtos, processos e Serviços – Cultivar. Feijão-caupi Tumucumaque. Disponível em: <https://www.embrapa.br/meio-norte/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/435/feijao-caupi-brs-tumucumaque>. 2009. Acesso em fevereiro de 2016.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produtos, processos e Serviços – Cultivar. Feijão-caupi Xiquexique. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/meio-norte/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/432/feijao-caupi-brs-xiquexique>. 2008. Acesso em fevereiro de 2016.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produtos, processos e Serviços – Cultivar. Feijão-caupi Aracê. Disponível em: <https://www.embrapa.br/meio-norte/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/985/feijao-caupi-brs-arace>. 2009. Acesso em fevereiro de 2016.

FANG, C. L.; ZHUO, Z.; FANG, S. L.; FENG, M. Y. J. Iron sources on iron status and gene expression of iron related transporters in iron-deficient piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 182, p. 121-125, 2013.

FILHO, F. R. F. **Feijão-Caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011, 84p.

FLEMING, R. E.; SLY, W. S. Hpcidin: A putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. **PNAS**, v. 98, n. 15, p. 8160-8162, 2001.

FROTA, K. M. G; SOARES, R. A. M; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008.

GARCIA-CASAL, M.N.; LAYRISSE, M. Food iron absorption: role of vitamin A. **Arch. Latinoam. Nutr.** v.48, 3, 191-196, 1998.

GARCIA, Y.; CASTRO, J.; LOPEZ-ALIAGA, I.; ALFEREZ, M. J. M.; RAMOS, A.; CAMPOS, M. S. Bioavailability of Fe, Cu, Zn and antioxidant defence in anemic rat supplemented with a mixture of heme/non-heme Fe. **Journal of Food and Nutrition Research**. v.52, n.2, p.128-138, 2013.

GIBSON, R. S.; BAILEY, K. B.; GIBBS, M.; FERGUSON, E. L. A review of phytate, iron, zinc, and calcium concentrations in plant-based complementary foods used in low-income countries and implications for bioavailability. **Food and Nutrition**

Bulletin. v.31, n.2, 2010.

GOMES, M. J. C.; INFANTE, R. A.; SILVA, B. P.; MOREIRA, M. E. C.; DIAS, D. M.; LOPES, R. C. S. O.; TOLEDO, R. C. L.; QUEIROZ, V. A. V.; MARTINO, H. S. D. Sorghum extrusion process combined with biofortified sweet potato contributed for high iron bioavailability in Wistar rats. **Journal of Cereal Science.** n. 75, p.213-219, 2017.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e hemoterapia**, v.30, n. 5, p. 390-397, 2008.

HAAS, J. D.; BEARD, J. L.; MURRAY-KOLB, L. E.; DEL MUNDO, A. M.; FELIX, A.; GREGORIO, G. B. Iron-biofortified rice improves the iron stores of nonanemic Filipino women. **Nutr J.** v.135(12), p.2823-2830, 2005.

HARVEST PLUS. Crops. Disponível em: <http://www.harvestplus.org/content/crops>. Acesso em março de 2016.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism. **Cell**, v. 117, p. 285-297, 2004.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; GALY, B.; CAMASCHELLA, C. Two Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. **Cell**, v. 142, 2010.

HURRELL, R. F.; JUILLERAT, M. A.; REDDY, M. B.; LYNCH, S. R.; DASSENKO, S. A.; COOK, J. D. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. **Am. J. Clinical Nutr.** v.56(3), 573-578, 1992.

HURRELL RF. Bioavailability—a time for reflection. **Int J Vitam Nutr Res.** V.72:5–6, 2002.

HURRELL RF. Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. **Int J Vitam Nutr Res.** V.74:445–52, 2004.

LA FRANO, M. R.; DE MOURA, F. F.; BOY, E.; LÖNNERDAL, B.; BURRI, B. J. Bioavailability of iron, zinc, and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. **Nutr. Rev.** v.72(5), 289-307, 2014.

LEAL, M.; DAMASCENO, K.; MOREIRA-ARAÚJO, R.; SILVA, M. G. S. S.; BARROS, N. V. A.; PORTO, R. G. C. L. Teor de ferro e zinco em farinhas de grãos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) geneticamente melhorados. **Simpósio Latino Americano de Ciências dos Alimentos.** v. 1, p.2447-2840, 2013.

MAHAN, L. K.; STUMP, S. E.; RAYMOND, J. L. **Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia.** 13 Edição. Elsevier, 2013.

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

MARQUES, M. F.; MARQUES, M. M.; XAVIER, E. R.; GREGORIO, E. L. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. **HU Revista,** v.38, n.1 e 2, p. 29-36, 2012.

MEYNARD, D.; BABITT, J. L.; LIN, H. Y. The liver: conductor of systemic iron balance. **Blood,** v. 123, n. 2, 2014.

MED, S. J. M.; MED, C. W.; MED, L. L.; ZHAO, D. Vitamin A deficiency aggravates iron deficiency by upregulating the expression of iron regulatory protein-2. **Nutrition,** v.30, p.281-287, 2012.

MEJIA, L. A.; CHEW, F. Hematological effect of supplementing anemic children with vitamin A alone and in combination with iron. **Am. J. Clin. Nutr,** v. 48, n. 3, p. 595-600, 1988.

MOURA, N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e**

Tecnologia de Alimentos de Campinas, v.26, p. 270-276, 2006.

MURGIA, I; AROSIO, P; TARANTINO, D; SOAVE, C. Biofortification for combating 'hidden hunger' for iron. **Trends in plant science**, v. 17, n. 1, p. 47-55, 2012.

NEMETH, E.; TUTTLE, M. S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M. B.; DONOVAN, A.; WARD, D. M. Heparin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. **Science**, v. 306, 2004.

NUTTI, M. R; CARVALHO, J. L. V; GONZALEZ, C. Biofortification in Latin America and the Caribbean Region. Proceedings of 535th XSSC Academic Symposium, Nutrition-oriented Agriculture for health. Beijing. 88p. 2015.

NUTTI, M. R. Biofortificação no Brasil: Os projetos Harvestplus, Agrosalud e Biofort. Embrapa Agroindústria de Alimentos. **3º Reunião Anual de Biofortificação no Brasil**. Aracaju, 2009.

OATES, P.S. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. **Histology and Histopathology**. V.22, 791-804, 2007.

OLIVEIRA, J. E. D. REUNIÃO ANUAL DE BIOFORTIFICAÇÃO NO BRASIL, 3., 2009. Aracaju. A biofortificação, a fortificação de alimentos e a deficiência de micronutrientes. **3º Reunião Anual de Biofortificação no Brasil**. Aracaju, 2009.

PACHÓN, H.; ORTIZ, D.A.; ARAUJO, C.; BLAIR, M.W.; RESTREPO, J. Iron, zinc, and protein bioavailability proxy measures of meals prepared with nutritionally enhanced beans and maize. **Journal of Food Science**. 74: H147-H154, 2009.

PEDROSA, L.F.C., COZZOLINO, S.M.F. Efeito da suplementação com ferro na biodisponibilidade de zinco em uma dieta regional do nordeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.27, n.4, p 266-270, 1993.

PETRY, N.; EGLI, I.; GAHUTU, J. B.; TUGIRIMANA, P. L.; BOY, E.; HURRELL, R. Stable iron isotope studies in Rwandese women indicate that the common bean has limited potential as a vehicle for iron biofortification. **J. Nutr.** v.142(3), 492-497, 2012.

PETRY, N.; EGLI, I.; CAMPION, B.; NIELSEN, E.; HURRELL, R. Genetic reduction of phytate in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds increases iron absorption in young women. **J. Nutr.** v.143(8), 1219-1224. 2013.

PFEIFFER, W. H. HarvestPlus: State-of-Art and Program Strategic Priorities in Biofortified Crop Development and Commercialization . Proceedings of 535th XSSC Academic Symposium, Nutrition-oriented Agriculture for health. Beijing. 28p. 2015.

PIZARRO, F.; OLIVARES, M.; VALENZUELA, C.; BRITO, A.; WEINBORN, V.; FLORES, S.; ARREDONDO, M. The effect of proteins from animal source foods on heme iron bioavailability in humans. **Food Chemistry.** v.196, p.733-738, 2016.

SEMBA, R. D.; BLOEM, M. W. The anemia of vitamin A deficiency: epidemiology and pathogenesis. **Eur. J. Clin. Nutr.** V.56(4), 271-281, 2002.

SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença.** 10. Ed. Manole, 2002.

QIN, L. Y.; BIN, B.; QING, Z. Q.; HONG, Y.; HUA, Z. G. Quantitative Study of Iron Metabolism-related Genes Expression in Rat. **Biomed Environ Sci**, 26(10): 808-819, 2013.

RAMALHO R. A.; FLORES H.; SAUNDERS, C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. **Rev Panam Salud Publica.** 12(2):117-22, 2002.

ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; FILHO, F. R. F.; CARVALHO, H. W. L.; VILARINHO, A. A.; FRANCO, L. J. D.; SANTOS, A. M. F.; NUTTI, M. R.; CARVALHO, J. L. V. Biofortificação do feijão-caupi no Brasil: resultados e perspectivas. **IV Reunião de Biofortificação.** Teresina, 2001.

ROCHA, M. M. R; FILHO, F. R. F; SIVA, K. J. D; RIBEIRO, V. Q; BARRETO, A. L. H; FRANCO, L. J. D; BASSINELO, P. Z; NUTTI, M. R; CARVALHO, J. L. V. **Avaliação dos conteúdos de proteína, ferro e zinco em germoplasma elite de feijão-caupi.**

Embrapa Meio-Norte, 2008 (Comunicado Técnico, 212).

ROUAULT, T. A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. **Nature Chemical Biology**, v. 2, p. 406-414, 2006.

ROUGHEAD, Z.K.; ZITO, C. A.; HUNT, J. R. Initial uptake and absorption of nonheme iron and absorption heme iron in humans are unaffected by the addition of calcium as cheese to a meal with high iron bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76:419-25, 2002.

SCHEERS, N. M.; SANDBERG, A. S. Ascorbic acid uptake affects ferritin, Dcytb and Nramp2 expression in Caco-2 cells. **Eur J Nutr**, 47(7):401–408, 2008.

SCHROEDER, S. E; REDDY, M. B; SCHALINSKE, K. L. Retinoic acid modulates hepatic iron homeostasis in rats by attenuating the RNA-binding activity of iron regulatory protein. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p.2686-2690, 2007.

SINGH, K. Biofortification strategy for enrichment of food crops with zinc to tackle zinc malnutrition in human populations: a review . Proceedings of 535th XSSC Academic Symposium, Nutrition-oriented Agriculture for health. Beijing. 84p. 2015.

SINGH, P; PRASAD, S; AALBERSBERG, W. Bioavailability of Fe and Zn in selected legumes, cereals, meat and milk products consumed in Fiji. **Food Chemistry**, v. 207, p. 125-131, 2016.

SHAYEGHI, M.; LATUNDE-DADA, G.O.; OAKHILL, J. S.; LAFTAH, A. H.; TAKEUCHI, K.; HALLIDAY, N.; KHAN, Y.; WARLEY, A.; MCCANN, F. E.; HIDER, R. C.; FRAZER, D. M.; ANDERSON, G. J.; VULPE, C. D.; SIMPSON, R. J.; MCKIE, A. T. Identification of an intestinal heme transporter. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 789-801, 2005.

SONNWEBER, T.; RESS, C.; NAIRZ, M.; THEURL, I.; SCHROLL, A.; MURPHY, A.T.; WROBLEWSKI, V.; WITCHER, D.R.; MOSER, P.; EBENBICHLER, C.F.; KASER, S.; WEISS, G. High-fat diet causes iron deficiency via hepcidin-independent reduction of duodenal iron absorption, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, p.1600-1608, 2012.

TAKO, E.; BLAIR, M. W.; GLAHN, R. P. Biofortified red mottled beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in a maize and bean diet provide more bioavailable iron than standard red mottled beans: Studies in poultry (*Gallus gallus*) and an in vitro digestion/Caco-2 model. **Nutr. J.** v. 10, 113, 2011.

TAKO, E.; GLAHN, R. P. White beans provide more bioavailable iron than red beans: studies in poultry (*Gallus gallus*) and an in vitro digestion/Caco-2 model. **Int J Vitam Nutr Res**, 80(6):416-429, 2010.

TAKO, E., HOEKENGA, O.A., KOCHIAN, L.V., GLAHN, R.P. High bioavailability iron maize (*Zea mays* L.) developed through molecular breeding provides more absorbable iron in vitro (Caco-2 model) and in vivo (*Gallus gallus*). *Nutr. J.* 12, 1e11, 2013.

VYORAL, D.; PETRAK, J. Therapeutic potential of hepcidin – the master regulator of iron metabolism. *Pharmacological research*. n.115, p. 242-254, 2017.

XU J.; HWANG JC.; LEES HÁ.; WOHLGEMUTH SE.; KNUTSON MD.; JUDGE AR. Long-term perturbation of muscle iron homeostasis following hindlimb suspension in old rats is associated with high levels of oxidative stress and impaired recovery from atrophy. **Exp Gerontol**. 2012 Jan;47(1):100-8.

ZOLLER, H.; THEURL, I.; KOCH, R.; KASER, A.; WEISS, G. Mechanisms of Iron Mediated Regulation of the Duodenal Iron Transporters Divalent Metal Transporter 1 and Ferroportin 1. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v.29.n3, p.488-497, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/>. Acesso em março de 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



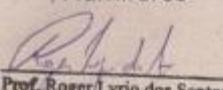
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da Biodisponibilidade de Ferro e sua interação com a vitamina A em alimentos biofortificados", Protocolo nº.72/2016, sob a responsabilidade de Neuza Maria Brunoro Costa que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 07-04-2017.

Vigência do Projeto	Início: Agosto/2017 Término: Fevereiro/2018
Espécie/Linhagem	Ratos <i>Wistar</i>
Nº de Animais	Experimento Piloto: 0 Experimental: 216 Total: 216
Peso/Idade	Peso: 50 a 60 gramas Idade: 21 dias
Sexo	Macho
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 07 de abril de 2017.


Prof. Roger Lyrio dos Santos
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/CCS/UPES