



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

PAULA TAVARES ANTUNES

**BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E SUA INTERAÇÃO COM A VITAMINA A EM
ALIMENTOS BIOFORTIFICADOS**

ALEGRE – ES

MARÇO-2018

PAULA TAVARES ANTUNES

**BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E SUA INTERAÇÃO COM A VITAMINA A EM
ALIMENTOS 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

ALEGRE – ES
MARÇO– 2018

PAULA TAVARES ANTUNES

**BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E SUA INTERAÇÃO COM A VITAMINA A EM
ALIMENTOS 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 _01___ de ____março_____ de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Neuza Maria Brunoro Costa
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr.^a Maria das Graças Vaz Tostes
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Prof. Dr.^a Daniela da Silva Oliveira
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinadora

Prof. Dr.^a Priscila Brigide
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, Rossine e Maura, por sempre me incentivarem a buscar pelos meus sonhos e me proporcionarem uma educação de qualidade. Essa conquista também é deles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me proporcionou realizar meu sonho e guiou os meus passos até aqui.

Aos meus pais, Rossine e Maura, por confiarem em mim, incentivando a seguir sempre em frente e serem exemplo de vida.

Aos meus irmãos, José e Laura, e minha prima e grande amiga, Kelly, por sempre me apoiarem.

À minha orientadora, Neuza Maria Brunoro Costa pela excelente orientação, contribuições e incentivos para minha formação profissional. Agradeço pela confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora, Maria das Graças Vaz Tostes, pelo auxílio e contribuição neste trabalho.

À minha banca: Dr^a Priscila Brigide e Dr^a Daniela da Silva Oliveira, pelas sugestões e enriquecimento para o trabalho.

Aos professores do PCTA e demais funcionários que contribuíram nessa etapa de minha formação.

Ao técnico, Eduardo Lorencetti Fornazier, por toda disponibilidade e grande auxílio no experimento. E aos demais técnicos Marcelo, Larissa e Renata, por toda cooperação.

Aos meus amigos da turma 2016/1 da pós-graduação: Caroline, Cíntia, Clara, Eduardo, Leandro, Pamela, Patrick, Renata, Rovená, e em especial Bruna e Raphael, por sempre estarem comigo e tornar essa caminhada mais divertida.

À Cíntia Tomaz Sant'Ana, pela ajuda e colaboração, obrigada pela parceria.

Aos que colaboraram com o experimento, Renata Araújo, Tuane, Renata Figliuzzi, Thaisa e Alexandre, meu muito obrigada.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo fornecimento das matérias-primas.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, que acompanharam e torceram pela conquista dessa etapa na minha formação.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Deficiência de micronutrientes	4
3.3 Ferro	4
3.3.1 Absorção.....	4
3.3.2 Função.....	6
3.3.3 Interações Nutricionais	7
3.2 Vitamina A.....	7
3.2.1 Absorção.....	8
3.2.2 Função.....	8
3.2.3 Deficiência de vitamina A (DVA).....	9
3.2.4 Fontes.....	9
3.4 Interações ferro x vitamina A	10
3.5 Programas de biofortificação	11
3.5.1 Feijão-caupi	11
3.5.2 Mandioca	12
3.6 Biodisponibilidade de nutrientes.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14

4.1 Matéria-prima.....	14
4.2 Preparo das matérias-primas.....	14
4.3 Determinação da Composição dos alimentos.....	14
4.3.1 Proteínas.....	14
4.3.2 Lipídeos.....	14
4.3.3 Umidade.....	15
4.3.4 Cinzas.....	15
4.3.5 Fibras.....	15
4.3.6 Carboidratos.....	18
4.3.7 Compostos Fenólicos.....	18
4.3.8 Teor de ferro.....	18
4.3.9 Valor Energético Total (VET).....	19
4.3.10 Fitato.....	19
4.3.11 Razão molar fitato/ferro.....	19
4.4 Biodisponibilidade de ferro.....	19
4.4.1 Preparo da dietas.....	19
4.4.2 Ensaio Biológico.....	21
4.4.3 Determinação da hemoglobina.....	22
4.5.2 Síntese cDNA.....	24
4.5.3. Quantificação dos transcritos por transcrição reversa seguida de PCR em tempo real.....	25
4.6 Análise Estatística.....	26
4.7 Aspectos Éticos.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Composição química.....	27
5.2 Ensaio biológico.....	33
5.3 Análises Biomoleculares.....	37

6. CONCLUSÃO	41
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética.....	52

RESUMO

TAVARES ANTUNES, PAULA. **Biodisponibilidade de ferro e sua interação com a vitamina A em alimentos biofortificados**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neuza Maria Brunoro Costa. Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Vaz Tostes.

Os hábitos alimentares inadequados levam à deficiência nutricionais na população, acarretando problemas de saúde pública. Para controlar esse déficit algumas tentativas vem sendo utilizadas, tais como os programas de suplementação, fortificação e a biofortificação. A biofortificação visa enriquecer alimentos básicos para a população, como feijão e mandioca com ferro, zinco e pró-vitamina A. A vitamina A pode influenciar no metabolismo do ferro, aumentando sua absorção e liberação dos estoques corporais, porém, pouco é conhecido sobre o seu papel na biodisponibilidade de ferro de alimentos biofortificados. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da vitamina A na biodisponibilidade de ferro em mistura de alimentos biofortificados. Foram utilizadas como matéria-prima feijão-caupi e mandioca biofortificados e convencionais. Inicialmente as amostras foram cozidas e moídas e após foram determinados a composição centesimal da matéria-prima e realizado um estudo *in vivo*, em ratos Wistar, 5 grupos de 8 animais, para se avaliar o ganho de hemoglobina, através do método de depleção-repleção e os efeitos do consumo da mistura de caupi e mandioca biofortificados em biomarcadores do metabolismo do ferro. Foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre os grupos experimentais. O feijão-caupi biofortificado (BRS Aracê) apresentou um aumento de aproximadamente 19,5% no teor de ferro em relação ao feijão-caupi convencional (BRS Nova era). Paralelamente, o feijão biofortificado apresentou maiores teores de fitatos, compostos fenólicos e de fibras em relação ao convencional. A relação molar fitato/ferro, entretanto, não diferiu entre os feijões caupi biofortificado e convencional, o que pode ter refletido no ganho de hemoglobina e HRE semelhantes entre os grupos, independente da presença de vitamina A. O feijão caupi biofortificado com ferro mostrou-se semelhante ao sulfato ferroso quanto à expressão das proteínas hefaestina e ferroportina, sugerindo uma maior eficiência na absorção intestinal de ferro. Por outro lado, o feijão convencional apresentou menor expressão de transferrina quando comparado com o grupo controle, sulfato ferroso, o que indica menor absorção do ferro nesses grupos. A expressão de ferritina no fígado foi menor no grupo alimentado com ambos os alimentos biofortificados (FBMB), o que pode indicar maior mobilização das reservas de ferro hepático na presença de vitamina A. Entretanto, não foi observada diferença entre os grupos quanto às demais proteínas analisadas, DCytB e DMT-1. Assim, o presente estudo aponta maior eficiência do feijão caupi biofortificado na biodisponibilidade de ferro, independente da presença da vitamina A.

Palavras-chave: Feijão-de-corda; mandioca; biodisponibilidade

ABSTRACT

TAVARES ANTUNES, PAULA. **iron bioavailability and its interaction with vitamin A in biofortified foods**. 2018. Dissertation (MSc Food Science and Technology) – Federal University of Espírito Santo, Alegre – ES. Advisor: Prof.^a Dr.^a Neuza Maria Brunoro Costa. Co-advisor: Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Vaz Tostes.

Inadequate dietary habits lead to nutritional deficiencies in the population, leading to public health problems. To control this deficit some attempts have been made, such as supplementation, fortification and biofortification programs. Biofortification aims to enrich basic food for the population, such as beans and cassava with iron, zinc and pro-vitamin A. Vitamin A may influence iron metabolism, increasing its absorption and release of body stores, but little is known about its role in the bioavailability of iron from biofortified foods. The aim of this study was to evaluate the effect of vitamin A on the bioavailability of iron in biofortified food mix. Raw and conventional biofortified cowpea and cassava were considered as raw material. Initially the samples were cooked and ground for the determination of the centesimal composition of the raw material and an *in vivo* study in Wistar rats. Five groups of 8 animals were performed to evaluate the hemoglobin gain through the depletion-repletion method and the effects of the consumption of the biofortified cowpea and cassava mixture on biomarkers of iron metabolism. An analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Tukey test ($p < 0.05$) for comparison between the experimental groups. Biofortified cowpea (BRS Aracê) showed an increase of approximately 19.5% in iron content in relation to conventional cowpea (BRS Nova era). In parallel, the biofortified beans presented higher levels of phytates, phenolic compounds and fibers in relation to conventional beans. The phytate / iron molar ratio, however, did not differ between the biofortified and conventional cowpea beans, which may have reflected the similar hemoglobin and HRE gain between the groups, regardless of the presence of vitamin A. Iron-biofortified cowpea beans were similar to ferrous sulfate for the expression of the hephaestin and ferroportin proteins, suggesting a greater efficiency in intestinal iron absorption. On the other hand, the conventional bean presented lower expression of transferrin when compared to the control group, ferrous sulfate, indicating lower iron absorption in these groups. The expression of ferritin in the liver was lower in the group fed with both biofortified foods (FBMB), which may indicate a greater mobilization of hepatic iron stores in the presence of vitamin A. However, no difference was observed between the groups for the other proteins analyzed, DCytB and DMT-1. Thus, the present study indicates a higher efficiency of biofortified cowpea in the bioavailability of iron, regardless of the presence of vitamin A.

Key words: Cowpea; cassava; bioavailability .

1.INTRODUÇÃO

O Brasil vem passando por um processo de transição nutricional, caracterizado pelo crescente número de pessoas com excesso de peso e a diminuição da desnutrição. Paradoxalmente, a população sofre de deficiência de micronutrientes, conhecida como fome oculta. Essa desnutrição é resultado de uma dieta de má qualidade, com o consumo de alimentos calóricos, porém, pobres em nutrientes, devido à baixa ingestão de grãos de leguminosas, frutas e hortaliças (MALTA et al., 2016). A má alimentação leva à deficiência de vários minerais essenciais para a saúde humana, com grande destaque para o ferro (Fe) e zinco (Zn), bem como de vitamina A que, em conjunto ou isoladamente, constituem problemas de saúde pública (BRASIL, 2007).

A deficiência de ferro considerada um dos mais importantes problemas nutricionais no Brasil, tendo como consequência a anemia ferropriva, devendo ser investigada precocemente, pois a carência de ferro ocorre de forma gradual e progressiva no organismo. Um dos principais sintomas são o retardo do desenvolvimento neurofisiológico, redução da capacidade intelectual, além de fraqueza física (ARREOLA-SIDA et al., 2015; GONÇALVES et al., 2015).

Deficiência subclínica e clínica de vitamina A, é a mais prevalente deficiência vitamínica, principalmente em crianças, tendo como consequência a cegueira noturna. Exerce funções na proliferação e diferenciação celular, e efeito positivo na absorção de ferro no organismo (NETO, PRIORE eFRANCESCHINI, 2007).

Estratégias de combate às deficiências nutricionais têm sido implementadas juntamente com a reeducação alimentar, tais como a utilização de suplementos minerais e vitamínicos, além da fortificação de alimentos. Outra estratégia é a biofortificação de alimentos, desenvolvidos com a intenção de melhorar a qualidade nutricional dos produtos agrícolas, aumentando a concentração de nutrientes por meio de melhoramento genético (CEBALLOS et al., 2012; MOURA et al., 2014; PETRY et al., 2015).

Com isso, programas foram desenvolvidos para realizar essas práticas de biofortificação, como o HarvestPlus, de âmbito mundial. No Brasil, a rede BioFort, liderada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária(EMBRAPA), apresenta como uma das estratégias enriquecer alimentos por meio da

biofortificação,mandioca,arroz, feijão, feijão-caupi, batata, batata-doce,abóbora, milho e trigo (CARVALHO e NUTTI,2012;PHORBEE, OLAYIWOLA e SANNI, 2013; OLIVEIRA, 2014).

A mandioca é um dos alimentos veículos de vitamina A pela biofortificação, contendo maior teor de β -caroteno. É um alimento rico em carboidrato, no qual faz apresentar boa energia, e tem como vantagem a sua produção, por ser resistente à seca, às pragas e doenças, além do seu baixo custo (SILVA, 2016).

O feijão-caupi, também chamado de feijão-de-corda,feijão-de-praia e feijão-miúdo (FERNANDES, NISHIDA e PROENÇA,2010) é enriquecido com Fe e Zn (EMBRAPA, 2009; OLIVEIRA, 2014; GONÇALVES et al., 2015).Tem sua importância juntamente com o arroz, pois são alimentos do cotidiano brasileiro. A mistura de ambos com mandioca é típico do nordeste brasileiro, sendo veículo de nutrientes, e podendo aumentar a biodisponibilidade dos mesmos (MOURA , 2011).

Essa alternativa complementar vem sendo intensificada através de parcerias do setor privado com o público, devido a sua grande importância, de tentativa de minimizar ou erradicar a desnutrição, sendo cientificamente viável, com custos relativamente baixos e acessível à população (CARVALHO e NUTTI,2012; MARQUES et al,2012). Visto que a vitamina A influencia positivamente na biodisponibilidade do ferro, é de grande valia o estudo da interação desses nutrientes e do consumo concomitante de alimentos, para uma melhor eficácia da biofortificação (SALES, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da pró-vitamina A na biodisponibilidade de ferro em mistura de alimentos biofortificados.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a composição química dos alimentos

Avaliar a concentração de ferro do feijão-caupi convencional e biofortificado;

Avaliar a concentração de β -caroteno da mandioca biofortificada;

Determinar o teor de compostos fenólicos totais, fitatos e fibras;

Avaliar a biodisponibilidade de ferro de misturas de arroz convencional com feijão caupi e mandioca convencional e biofortificados;

Determinar a expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Deficiência de micronutrientes

O Brasil vem passando nos últimos anos por um processo de transição nutricional, marcado por modificação dos hábitos alimentares da população, resultado do aumento do consumo de alimentos calóricos, concomitante a redução da ingestão de frutas e hortaliças, e monotonia alimentar. Em consequência houve diminuição de prevalência de desnutrição e aumento da obesidade, junto às deficiências nutricionais, considerado problema de saúde pública (CARVALHO e NUTTI, 2012).

A fome oculta resultante da deficiência de micronutrientes, afeta cerca de 795 milhões de pessoas no mundo. Os hábitos alimentares inadequados geram insegurança alimentar, em que parte da população é afetada pela fome e miséria, interferindo em seu estado nutricional por meio da deficiência de nutrientes, sendo as maiores vítimas dessa situação, crianças e idosos (BARBOSA, 2015; FAO, 2015). Em crianças, cerca de 162 milhões sofrem de má nutrição e cerca de 55 milhões encontra-se em estado de desnutrição (SHARMA et al., 2016).

A má nutrição causa efeitos desfavoráveis no organismo, aumentando a suscetibilidade a doenças crônicas não transmissíveis. Nestas condições, é necessária uma maior atenção ao consumo de vitaminas e minerais, devido a deficiências de maior incidência, como hipovitaminose A e anemia ferropriva (OLIVEIRA, 2014; BARBOSA, 2015).

3.3 Ferro

É um mineral constituinte do corpo humano, presente na forma orgânica e inorgânica. Está amplamente presentes, em alimentos, na forma heme, em carnes e vísceras, por estar ligado à hemoglobina e mioglobina e não-heme em produtos de origem vegetal, tais como leguminosas e vegetais verdes-escuros e demais alimentos de origem animal (MARTINI, 2012).

3.3.1 Absorção

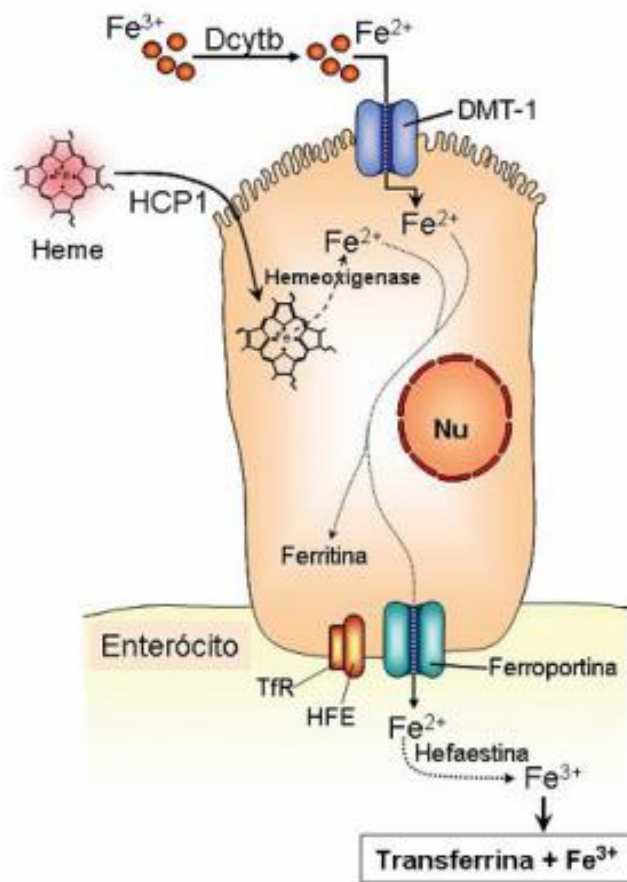
O ferro é encontrado na forma férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}). A absorção ocorre no intestino delgado, na porção superior do epitélio, que

apresentamicrovilosidades para uma maior superfície de contato e consequentemente maior absorção (GROTTO, 2010).

O Ferro heme é internalizado através da proteína transportadora do heme-1 e na forma não-heme, o ferro no estado oxidado (Fe^{3+}) para ser absorvido (Fig. 1) precisa ser reduzido (Fe^{2+}), isso ocorre através da ação da enzima redutasecitocromo b duodenal (DcytB), então o transportador de metal divalente-1 (DMT-1) permite a passagem do ferro(GROTTO, 2010).

Há dois destinos para esse mineral, se o aporte no organismo estiver em quantidades normais, fica armazenado ligado a ferritina, se as concentrações estiverem baixas, é liberado para absorção. A externalização do ferro ocorre através da ferroportina, em um processo dependente de hefaestina, que é responsável pela oxidação do ferro Fe^{2+} em Fe^{3+} , devido a afinidade da transferrina pela forma férrrica. Será liberado, se ligando a transferrina no sangue, que é reconhecida por receptores específicos de transferrina (TfR)(GROTTO, 2010).

O receptor de transferrina interage com a proteína da hemcromatose (HFE) para a regulação da absorção, através da sinalização de uma maior ou menor necessidade de aporte de ferro no organismo. Sendo assim, em momentos que existe a falta ou aumento da necessidade de ferro no organismo, há uma maior absorção desse mineral (GROTTO, 2010).



Fonte: Grotto (2008)

Figura 1: Metabolismo de Ferro: O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferredutase; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor da transferrina

3.3.2 Função

O ferro tem diversas funções no metabolismo: estar envolvido no ciclo de Krebs, constituinte da citocromo C e catalase, é essencial para o crescimento celular e síntese proteica e participa do transporte de oxigênio da hemoglobina e mioglobina (CUNHA, 2013).

Sendo assim, este mineral é fundamental para a homeostase celular, pois atua em diversas funções. Portanto, sua deficiência causa uma doença de grande importância para a saúde pública, a anemia ferropriva (GROTTO, 2010).

Essa doença é resultando de um longo período de privação deste mineral, resultando em um balanço negativo. Com isso, pode haver alterações no crescimento e desenvolvimento de crianças, e redução da imunidade, sendo mais

suscetíveis a doenças, atuando principalmente na oxigenação dos nervos, afetando o sistema nervoso (ZARTARIAN, 2014).

Os sintomas da sua deficiência são palidez, fraqueza e fadiga, podendo levar a enxaqueca. Em crianças também podem afetar a atenção e provocar a sonolência, afetando as situações do cotidiano. Há aproximadamente 2 bilhões de pessoas anêmicas em todo mundo. A Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS), em 2006 avaliou a prevalência de anemia em crianças, totalizando aproximadamente 3 milhões de crianças brasileiras menores de 5 anos anêmicas, 20,9%. Em mulheres em idade reprodutiva não-grávidas, a prevalência foi de 29,4%, com maiores índices na região Nordeste (39,1%) (BRASIL, 2009).

3.3.3 Interações Nutricionais

Existem fatores que afetam positivamente ou negativamente a absorção deste mineral, tais como o ácido oxálico, ácido fítico e os polifenóis, devido à formação de quelatos que são insolúveis e reduzem a absorção de ferro. Minerais, como cálcio e zinco também podem afetar negativamente essa absorção, por competirem pelo mesmo sítio de ligação (BARRUETO-GONZALEZ, 2008; BUENO, MARCHINI e OLIVEIRA, 2011).

Por outro lado, existem os que afetam positivamente, como os produtos fermentados, ácido cítrico e lático. O ácido ascórbico também influencia nessa absorção, ele atua reduzindo o ferro³⁺ em ferro²⁺ e forma o complexo ferro-quelato, que é mais solúvel. Essas interações são influenciadas pela composição e quantidades das dietas, alterando assim o grau de influência na absorção (BUENO, MARCHINI e OLIVEIRA, 2011; SALES, 2012).

3.2 Vitamina A

É uma vitamina lipossolúvel, com estrutura química de 20 carbonos, composta por grupo metil ligado a β -iona e cadeia lateral isopropanoide. Pode ser encontrada nos alimentos de duas formas: vitamina A pré-formada, nos alimentos de origem animal e pró-vitamina A nos de origem vegetal, através dos carotenóides. O β caroteno é o carotenoide mais abundante nos vegetais e com maior atividade pró-vitamínica (QUEIROZ, 2011; LIMA, 2013).

São substâncias sensíveis à oxidação, luz, temperatura e acidez. Nos alimentos apresentam coloração amarela, laranja ou vermelha. O poder corante é

resultado da absorção da luz na região visível, sendo necessário o mínimo de 7 duplas ligações conjugadas para a coloração(SAINI, NILE e PARK, 2015; SILVA, 2016).

3.2.1 Absorção

Após a ingestão, o retinol e carotenoides são liberados no estômago, posteriormente são agregados aos lipídeos na parte superior do intestino delgado. Sendo 90% da vitamina A pré-formada absorvida na forma de ésteres de retinol (MARTINI, 2002).

A absorção ocorre no intestino delgado, e é facilitada pela presença de sais biliares, lipase pancreática, proteína e lipídeos, pois a secreção da bile ocorre na presença de lipídeos e proteínas, através da colecistocinina (CCK), ocorrendo a formação de micelas. O aumento da biodisponibilidade se dá na ingestão concomitante de gordura, devido a vitamina ser lipossolúvel (SILVA, 2016; PARADA E AGUILERA,2007).

Os carotenóides são convertidos a retinal, e posteriormente em retinol, através da enzima 15-15' β -caroteno monoxigenase. No interior da célula, é reesterificado em éster de retinil, sendo esterificado aos ácidos graxos, formando os quilomícrons no sistema linfático, liberando-os na circulação (BEZERRA, 2008).

Nos tecidos extra-hepáticos o retinol é oxidado em ácido retinóico ou é armazenado. Essa reserva é relevante nos períodos de baixa ingestão alimentar ou em situações que ocorram a necessidade de um maior aporte dessa vitamina. Podem ser incorporado em diversos órgãos, como fígado, pulmão, colo do útero, pele, entre outros (BEZERRA, 2008; LIMA et al, 2012).

3.2.2 Função

A vitamina A tem diversas funções no metabolismo, na diferenciação e proliferação células, integridade das paredes epiteliais, sendo essencial para a visão. A vitamina A se combina com a opsina, formando a rodopsina, e assim mantendo a visão em ambientes pouco iluminados. Devido à sua ação no sistema imunológico, é conhecida como vitamina anti-infecção(LIMA, 2013; BERNI et al, 2014).

3.2.3 Deficiência de vitamina A (DVA)

A quantidade diária necessária para suprir as necessidades da vitamina A diferem de acordo com faixa etária, sexo e condições fisiológicas, tal como a gestação. Quando não há o consumo em concentrações corretas por longo período ocorre um déficit dessa vitamina (BEZERRA, 2008).

No Brasil, a DVA é considerada um dos principais problemas nutricionais, sendo as crianças mais suscetíveis ao desenvolvimento. O surgimento da deficiência é ocasionado pela ingestão inadequada de alimentos fontes de vitamina A (AMBRÓSIO, CAMPOS e FARO 2006; SILVA, 2014).

A fase avançada dessa deficiência é caracterizada como xerofthalmia. Para ser avaliada, são realizados exames clínicos para dosagem de retinol sérico (Quadro 1), em casos inferiores a 0,20 µg/dL são considerados deficientes (SILVA, 2014).

Quadro 1: Classificação da deficiência de vitamina A, segundo concentração sérica de retinol

Classificação	Nível de retinol sérico	
	µ/dL	Mmol/L
Normal	>30,0	>1,05
Aceitável	20,0-29,9	0,70 a 1,04
Baixo	10,0 a 19,9	10,35 a 0,69
Deficiente	<10,0	<0,35

Fonte:WHO, 1996

Em grupos de alto risco, o Ministério da Saúde implantou o Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A, com objetivo de reduzir a deficiência em crianças de 6 a 59 meses e puérperas no pós-parto, através da Portaria nº 729, de 13 de maio de 2005 (BRASIL, 2012). Outra forma de profilaxia é a fortificação ou biofortificação de alimentos, que aumentam a concentração desse nutriente em alimentos específicos (PHORBEE, OLAYIWOLA e SANNI, 2013).

3.2.4 Fontes

A alimentação saudável é uma forma de evitar carência da vitamina A, pois é um nutriente que pode ser encontrado como vitamina pré-formada, em alimentos de

origem animal, tais como fígado, leite integral, ovos e na forma de pró-vitamina, em alimentos de origem vegetal de coloração amarela e laranja (LIMA, 2013).

3.4 Interações ferro x vitamina A

O sinergismo entre esses dois micronutrientes ainda não está completamente elucidado, mas estudos demonstram que a ingestão de vitamina A influencia positivamente nos estoques de ferro, aumentando a sua depleção dos estoques de ferro no fígado e assim tornando-o mais biodisponível (SALES, 2012). Cunha et al (2013) encontraram uma diminuição significativa nos níveis séricos de ferro quando havia depleção de vitamina A.

Existe uma relação inversa entre o teor de retinol e ferro no fígado, pois quando há presença de vitamina A, o ferro é liberado para absorção, reduzindo assim a concentração de estoques de ferro no fígado (MARTINI, 2002). Lynch (1997) relata que a deficiência de vitamina A reduz as concentrações de ferro para a medula óssea, devido a não mobilização de ferro para a absorção.

Mwanri et al (2000) encontraram que a suplementação de ferro concomitante a de vitamina A, pode apresentar uma maior taxa de hemoglobina quando comparada a ingestão desses suplementos separados.

Layrisse et al (1997) relataram através de análises cromatográficas que durante a digestão, a vitamina A se liga ao ferro formando um complexo, tornando o ferro solúvel no lúmen intestinal. Esse quelante atua também na redução da má absorção de ferro induzida pela presença de fitatos (NETTO, PRIORE E FRANCESCHINI, 2007).

A vitamina A age positivamente no sistema imune, resultando em uma diminuição das infecções, consequentemente reduz na síntese de ferritina, tornando o ferro mais biodisponível (SALES, 2012).

A partir desses efeitos benéficos ao organismo desses micronutrientes, visto que há grande parte da população com deficiência dos mesmos, são utilizados meios de aumentar o aporte no organismo. Uma das alternativas crescente é a biofortificação (CARVALHO e NUTTI, 2012).

3.5 Programas de biofortificação

O crescente interesse por alimentos que beneficiem a saúde incentivou o avanço dos estudos no campo de alimentos que reduzam os riscos às doenças, necessitando assim da inovação e melhoramento de recursos que tragam benefícios a saúde (VELLOZO e FISBERG, 2010).

Com o crescente número de pessoas com deficiências nutricionais necessitou-se a criação de alternativas para esse combate, tais como a suplementação vitamínica e mineral, a fortificação de alimentos, como também a biofortificação (BARBOSA, 2015).

A biofortificação é um processo em que é realizado melhoramento genético no qual resulta em alimentos com maiores teores de vitaminas e minerais, além da maior resistência às doenças. Diferentemente da fortificação, que se baseia na adição de micronutrientes durante a produção do alimento. Com isso, consegue-se ampliar o alcance do maior aporte de nutrientes para famílias de baixas rendas (BARBOSA, 2015).

Para a definição de quais alimentos serão biofortificados é observado se há uma considerável variação genética dos produtos agrícolas, se há qualidade nutricional, se são resistentes às doenças e pragas e quais fazem parte do hábito alimentar (CARVALHO e NUTTI, 2012).

A organização não governamental que implementa esse projeto no mundo é a HarvestPlus. No Brasil, esse projeto é coordenado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), fazendo parte da rede BioFORT, que tem o objetivo de minimizar a desnutrição e conseqüentemente a insegurança alimentar (BOUIS et al, 2011; ARREOLA-SIDA et al, 2015).

Com isso, a EMBRAPA desenvolveu cultivares com maiores teores de vitaminas e minerais, tais como arroz, feijão, trigo e feijão-caupi, ricos em ferro e zinco, e mandioca, milho, batata-doce e abóbora com maiores concentrações de β -caroteno (CARVALHO e NUTTI, 2012).

3.5.1 Feijão-caupi

É classificado botanicamente como uma planta eudicotyledonea, da ordem Fabales, família Fabaceae, espécie *Vigna unguiculata*(L.) Walp. e subespécie *unguiculata*(FREIRE FILHO et al., 2011). É conhecido popularmente como feijão-de-

corda, feijão-de-praia, feijão-miúdo e feijão fradinho (NEVES et al., 2011). Tem origem africana, e é um alimento muito consumido nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, principalmente na forma de grãos secos, por ser uma espécie rica em ferro e proteína. O Brasil é o terceiro maior produtor e consumidor de feijão-caupi. A cultivar BRS Aracê tem grãos lisos, arredondados e de cor verde-oliva, é considerado adequado para processamento industrial, contém cerca de 55mg de Fe/Kg de feijão, e 25% de proteína (EMBRAPA, 2009; BARBOSA, 2015).

É muito importante para a dieta básica de regiões menos desenvolvidas, pois sua ingestão, juntamente com o arroz, fornece um apropriado balanço de aminoácidos (MOURA e CANNIATT-BRAZACA, 2006; BARRUETO– GONZALEZ, 2008; CARVALHO et al, 2011).

Devido ao seu valor nutricional, sua resistência às doenças e fazer parte do hábito alimentar, está incluído no programa de biofortificação (BioFORT). São produzidas as cultivares biofortificadas BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xiquexique. Podem ser comercializados como grãos secos, imaturos, farinhas e sementes (ROCHA, 2009).

3.5.2 Mandioca

Mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é um alimento altamente consumido no Brasil, e bem aceito na maior parte das regiões. É rica em carboidratos, e a biofortificada também é rica em compostos bioativos, como os carotenoides. É altamente consumida pelos brasileiros, especialmente os de baixa renda. Em relação à proteína, ela apresenta deficiência em aminoácidos sulfurados (BERNI, 2014).

Podem ser de coloração branca, amarelada, laranja, vermelha e roxa, tal variação ocorre devido à quantidade e tipo de pigmento que elas possuem (MEZETTE et al, 2009).

É uma planta cianogênica, podendo ser altamente tóxica por liberar ácido cianídrico (CN⁻), além do sabor desagradável, por isso é classificada em brava ou amarga (teor acima de 100mg/kg). Enquanto, mansa ou doce, apresenta teor menor que 100mg/kg, e possui sabor agradável (MEZETTE et al, 2009; SILVA, 2016).

É um alimento veículo de biofortificação devido à sua capacidade de resistir às pragas e doenças. A variedade biofortificada é a BRS Jari, com aproximadamente

9 µg de β-caroteno/g nas raízes frescas, no entanto, a mandioca convencional não apresenta teores de β-caroteno (SILVA, 2016).

3.6 Biodisponibilidade de nutrientes

Inicialmente, esse termo era utilizado na área farmacêutica para a utilização dos compostos. Na nutrição, a biodisponibilidade é a relação em que uma determinada substância ativa é digerida, absorvida e metabolizada. Diferentemente, a bioacessibilidade é caracterizada pela concentração de um nutriente liberado na digestão e torna-se mais disponível para a absorção intestinal, englobando todas as sequências do metabolismo (COZZOLINO, 1997; FENNEMA et al., 2008; COLLOU e SILVA, 2016).

Diversos fatores influenciam na biodisponibilidade, por isso tem sido bastante estudada para o entendimento do metabolismo, identificando fatores que podem ter ações positivas ou negativas na absorção de nutrientes (PARADA E AGUILERA 2007; CASGRAIN et al. 2010). Estudos afirmam que existe uma interação positiva da vitamina A ao metabolismo de ferro, participando da regulação de algumas proteínas envolvidas na absorção desse mineral (ARRUDA et al, 2009; CUNHA et al, 2013). Diante disso, é importante avaliar esse efeito da interação e dos fatores que influenciam positivamente, para uma melhor abrangência desse sistema de biofortificação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

Os alimentos testes foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sendo o feijão-caupi (*Vigna unguiculata L Walp*), cultivar BRS Aracê, biofortificado com ferro e zinco e a mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), cultivar BRS Jari, com beta-caroteno (pró-vitamina A), além do arroz (BRS Esmeralda) e feijão-caupi convencional (*Vigna unguiculata L Walp*), cultivar BRS Nova Era. A mandioca convencional foi obtida no mercado local.

4.2 Preparo das matérias-primas

O arroz e o feijão-caupi foram cozidos sob pressão com água deionizada (1:2 m/v), após foram secos em estufa com circulação de ar por 48h a 55°C. Com auxílio de um liquidificador doméstico os grãos foram triturados e peneirados, até atingir a consistência de farinha.

A mandioca passou apenas pelo processo de cozimento em ebulição com água deionizada por 15 min (1:2 m/v). Após esses procedimentos, foram determinadas suas composições nutricionais, em seguida, realizado o estudo *in vivo*. As análises químicas foram realizadas nos laboratórios de Química de Alimentos e Bromatologia e os estudos *in vivo*, no laboratório de Nutrição Experimental, ambos da Universidade Federal do Espírito Santo. As análises biomoleculares foram realizadas no laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Viçosa – MG.

4.3 Determinação da Composição dos alimentos

4.3.1 Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método Kjeldahl, segundo a AOAC (1998), utilizando fator de conversão igual a 6,25.

4.3.2 Lipídeos

A determinação de lipídeos foi realizada em aparelho de Soxhlet, utilizando éter de petróleo com o extrator solvente, por 4h, segundo a AOAC (1997).

4.3.3 Umidade

A umidade foi determinada por secagem a 105°C em placas previamente taradas, e submetidas a aquecimento em estufa de circulação forçada de ar (Steck®), até peso constante, segundo AOAC (1997). Após a secagem as amostras foram resfriadas em dessecador com sílica gel e pesadas em balança analítica digital (Shimadzu®). A umidade foi calculada pela diferença entre a amostra úmida e a seca.

4.3.4 Cinzas

Para a determinação do teor de cinzas, as amostras foram pesadas em cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados, incinerados em mufla (Stecno®) à 550°C, por 6h. Posteriormente, os cadinhos foram resfriados em dessecador com sílica gel e novamente pesados em balança analítica digital. O teor de cinzas foi determinado a partir da diferença de peso da amostra antes e após a incineração, segundo AOAC (1997).

4.3.5 Fibras

A determinação dos teores de fibras solúvel e insolúvel, foram realizadas de acordo com o método enzimático-gravimétrico (AOAC,1992), utilizando-se α -amilase termorresistente, protease e amiloglicosidade, para a hidrólise enzimática. Para a filtração utilizou-se cadinhos de vidro e celite como auxiliar de filtração.

4.3.5.1 Preparo dos cadinhos

Os cadinhos foram deixados de molho com detergente neutro a 20%, durante 24h. Foram enxaguados com água ultra pura e com vácuo em ambos os sentidos. Foram secos em estufa a 105°C por 1h e incinerados em mufla à 525°C por 5h e 45min. Foram resfriados, e em seguida lavados 5 vezes com 20mL de HCl 0,5N e posteriormente enxaguados três vezes com 20mL de água destilada no sentido oposto. Os cadinhos foram secos em estufa a 105°C por 12h e pesados. Foi pesado 1g de celite e foi adicionado aos cadinhos, que foram novamente secos a 105°C por 12h e após esse processo, foram pesados.

4.3.5.2 Obtenção do hidrolisado

Foi pesado em duplicata em torno de 1g de amostra (com precisão de 0,1mg) em um béquer de 600mL. Foi adicionado em cada béquer 50mL de tampão-fostato 6,0. Na solução foi adicionado 0,1mL de α -amilase termorresistente. O béquer foi tampado com folha de alumínio e aquecido em banho-maria (Tecnal®) à 97°C por 30 minutos, com agitação a cada 5 minutos.

As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente. O pH foi ajustado para $7,5 \pm 0,1$ adicionando em torno de 10mL de NaOH 0,275N. Em seguida, foi adicionado 0,1mL de protease (5mg/0,1mL) na solução pré-digerida e o béquer novamente tampado com a folha de alumínio e incubado à 60°C por 2h, com agitação horizontal (100rpm).

Após o hidrolisado ser resfriado à temperatura ambiente, foram adicionados em torno de 10mL de HCl 0,325N com finalidade de ajustar o pH em $4,3 \pm 0,3$. Posteriormente, foi adicionado 0,1mL de amiloglicosidase na solução e o béquer foi novamente tampado com folha de alumínio e incubado a 60°C por 2h com agitação horizontal (100rpm), para obtenção do hidrolisado final.

4.3.5.3 Determinação da fibra insolúvel

Os cadinhos com celite foram lavados com água ultra pura usando bomba à vácuo (Tecnal®). O hidrolisado contendo o resíduo foi transferido quantitativamente para os cadinhos e filtrados à vácuo. O resíduo nos cadinhos foram lavados com 10mL de água ultra pura (2 vezes), 20mL de etanol 95% (2 vezes) e 20 mL de acetona (2 vezes). Após esse processo, os cadinhos foram colocados em estufa à 105°C, overnight e em seguida pesados. Por fim, foram quantificados os teores de proteína e de cinzas.

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

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

m

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)

4.3.5.4 Determinação da fibra solúvel

Os cadinhos foram lavados duas vezes com 10mL de etanol 98%. A fração solúvel reservada no béquer foi transferida para o cadinho, após essa filtragem pela bomba a vácuo, o cadinho foi lavado três vezes com 20mL de etanol a 78%, duas vezes com 20mL de etanol a 95% e duas vezes com 20mL de acetona.

Os cadinhos foram colocados em estufa a 105°C overnight e em seguida pesados. Depois metade dos cadinhos foram incinerados em mufla por 5h e 45minutos a 525°C para a determinação de cinzas, e a outra metade foi realizada análise de proteína.

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)

4.3.6 Carboidratos

O teor de carboidratos foi obtido da diferença entre o total da amostra (100%) e os teores de proteína, lipídeo, fibra alimentar, umidade e cinza, segundo Brasil, (2001)

4.3.7 Compostos Fenólicos

4.3.7.1 Preparo do extrato

Foram utilizados o correspondente a 2g das amostras, a qual foi extraída em 20mL de metanol a 60% (v/v), sob aquecimento (100°C) e agitação constante por um período de 2 h. Após esse período foram centrifugados a 5.500rpm por 24min a 24°C, segundo metodologia descrita por Castro et al. (2009).

4.3.7.2 Doseamento de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

A estimativa do teor de compostos fenólicos totais foi determinada pelo método espectrofotométrico de acordo com Singleton et al. (1999), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Foi construída uma curva padrão de ácido gálico e os resultados foram em mg de Equivalente de Ácido Gálico (EAG). A mensuração por espectrofotômetro ELISA (ThermoScientific®) a 760nm.

4.3.8 Teor de ferro

Foi pesado 0,25g de amostra, e colocada em tubo de digestão, sendo adicionados a mistura ácidonítrico-perclórico (3:1), e realizado pré-digestão, por 12h em temperatura ambiente. Após, foram levados ao bloco digestor, a 250°C, aumentando gradativamente.

Foram adicionados 10mL de água destilada nas amostras em temperatura ambiente e agitado em agitador magnético. A amostra digerida foi transferida para balão de 25mL e completado com água destilada e filtrada com papel filtro. Por fim,

foi feita a leitura em espectrofotômetro de absorção atômica(HE, LOGAN e TRAINA, 1995).

4.3.9 Valor Energético Total (VET)

Foi calculado de acordo com Watt e Merrill (1963), utilizando os fatores de conversão de Atwater (carboidratos = 4,0kcal; lipídios = 9,0kcal; proteínas = 4,0kcal).

4.3.10 Fitato

A determinação de ácido fítico foi segundo Latta e Eskin (1980). 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 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,3g de ácido sulfosalicílico, 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.

4.3.11 Razão molar fitato/ferro

O cálculo foi realizado por meio da divisão do valor em molar de fitato e de ferro de cada amostra e dieta experimental. Foi considerado no cálculo, o peso molar do hexafosfato de mio-inositol (IP6) e do ferro, de 660g/mol e 55,85 g/mol, respectivamente. Ambos, fitato e ferro, tiveram seus valores representados em g/100g neste cálculo.

4.4 Biodisponibilidade de ferro

4.4.1 Preparo da dietas

As dietas foram preparadas de acordo com a dieta AIN-93G (REEVES et al, 1993), indicada para animais em fase de crescimento. Foram ajustadas para

fornecer 12mg Fe/kg de dieta, procedentes do sulfato ferroso (FeSO₄), na dieta controle e da farinha de feijão-caupi, nas dietas testes.

Para o cálculo das dietas testes, foi utilizado o teor de ferro e proteína dos feijões. Com isso foi estabelecida a quantidade de feijão, mandioca e arroz que foram usadas na dieta, como também a quantidade de albumina para completar em cada dieta, a fim de obter dietas isoproteicas.

Os ingredientes usados em maiores concentrações foram pesados, individualmente, em balança (Radwag®). Os ingredientes usados em menor proporção foram pesados em balança analítica (Shimadzu®). Inicialmente foram misturados manualmente em vasilhames de plástico previamente lavados e enxaguados com água ultra pura, após foram misturados em batedeira semi-industrial (Venâncio®), com baixa rotação, por 20 min e armazenados a 8°C em sacolas plásticas devidamente etiquetadas.

Os grupos experimentais receberam a seguinte composição

Grupo SF: Sulfato ferroso

Grupo FCMC: feijão convencional + mandioca convencional

Grupo FCMB: feijão convencional + mandioca biofortificada

Grupo FBMC: feijão biofortificado + mandioca convencional

Grupo FBMB: feijão biofortificado + mandioca biofortificada

Todos os grupos receberam adição de arroz convencional, exceto o grupo sulfato ferroso.

Tabela 1: Composição das dietas testes

ALIMENTOS	DEPLEÇÃO	REPLEÇÃO(g/1000g)				
		SF	FCMC	FCMB	FBMC	FBMB
Sulfato Ferroso	-	0,1495	-	-	-	-
Feijão NOVA ERA	-	-	253	253	-	-
Feijão ARACÊ	-	-	-	-	216	216
Arroz	-	-	214	214	182	182
Mandioca biofortificada	-	-	-	96	-	82
Mandioca convencional	-	-	96	-	82	-
Albumina	200	200	80	80	87	87
Maltodextrina	132	132	132	132	132	132
Sacarose	100	100	100	100	100	100
Óleo de Soja	70	70	70	70	70	70
Celulose	50	50	-	-	-	-
Mix minerais 0% Ferro	35	35	35	35	35	35
Mix vitamínico	10	10	10	10	10	10
L-Cistina	3	3	3	3	3	3
Bitartarato de Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido	397,5	397,5	4,5	4,5	80,5	80,5

SF: Sulfato ferroso;FCMC: Feijão convencional e Mandioca convencional; FCMB: Feijão convencional e Mandioca biofortificada; FBMC: Feijão biofortificado e Mandioca convencional; FBMB: Feijão biofortificado e Mandioca biofortificada.

4.4.2 Ensaio Biológico

Para o ensaio biológico, foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar, recém-desmamados, provenientes do Biotério Central da UFES campus Maruípe, com peso inicial médio de 70 g. Foi realizado o método de depleção/repleção de hemoglobina, seguindo a técnica da AOAC (1998), com adaptação para 21 dias de depleção e 14 dias de repleção. Este período foi suficiente para provocar anemia moderada.

4.4.2.1 Fase de depleção

Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas em aço inoxidável, com temperatura de 23°C±1° C e fotoperíodo de 12h.

Primeiramente, os animais receberam a dieta de depleção, isenta de ferro, por 21 dias e água ultra pura *ad libitum*. Após esse período foi quantificada a

hemoglobina, foi colhido sangue (10 µL) pela extremidade da cauda para determinação de hemoglobina e os animais anêmicos foram divididos em 5 grupos de 8 ratos cada, de acordo com a concentração de hemoglobina, de maneira que as médias dos grupos fossem as mais próximas possíveis.

4.4.2.2 Fase de repleção

Os animais foram de cada grupo receberam as dietas testes (12mg Fe/kg de dieta), sendo que o grupo controle o teor de ferro derivou do sulfato ferroso. Nesta fase os animais foram mantidos em suas dietas experimentais por 14 dias e receberam água ultra pura *ad libitum*. A ingestão de dieta foi controlada, fornecendo aproximadamente 18g de dieta por dia. Ao final desta fase, foram realizadas dosagens de hemoglobina dos animais, e calculou-se o ganho de hemoglobina pela diferença dos valores obtidos ao final das fases de repleção e depleção.

Ao término da fase de repleção, os animais foram anestesiados com solução de anestésico (0,2 mL de anestésico/100 g de animal) com cloridrato de xilazina 2% (Syntec) e cloridrato de cetamina 10% (Syntec). Foram colhidos o fígado e 5cm do intestino delgado superior, medidos imediatamente abaixo do estômago dos animais para determinação de análise biomolecular. Os Valores Relativos de Biodisponibilidade (RBV) de ferro dos alimentos testes foram calculados considerando o padrão (sulfato ferroso) com biodisponibilidade igual a 100%.

4.4.2.3 Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar

Calculou-se o ganho de peso e o consumo alimentar dos animais por meio do monitoramento semanal do peso dos animais e da dieta ofertada e restos alimentares. O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado pela relação do ganho de peso do animal (g) pelo consumo de dieta (g).

4.4.3 Determinação da hemoglobina

Para a determinação da hemoglobina (Hb) foi utilizado o método da cianometahemoglobina (AOAC, 1984), utilizando kits comerciais Bioclin®.

O volume de 10 µL de sangue da cauda dos animais foi misturado a 2,5mL do reagente de cor da solução de Drabkin, composta de cianeto de potássio e ácido cianídrico. Esse método baseia-se na reação colorimétrica, entre o ferro presente na

hemoglobina e o cianeto da solução de Drabkin, formando cianometahemoglobina, de coloração vermelha, cuja intensidade varia de acordo com o teor de ferro presente no sangue analisado. Pipetou-se 250µL em placa de ELISA de 96 poços e procedeu-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro ELISA (ThermoScientific®), no comprimento de onda de 540nm.

Com base na absorbância, calculou-se a concentração de hemoglobina (g/dL) em cada amostra de sangue a partir da concentração conhecida padrão, fornecida pelo kit comercial.

4.4.3.1 Eficiência na regeneração de hemoglobina (HRE)

Foi calculada utilizando a fórmula:

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

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:

$RBV-HRE = HRE \text{ de cada animal} / \text{Média de HRE do controle positivo}$

4.5 Análise biomolecular

4.5.1 Extração de mRNA total da mucosa duodenal e do fígado

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen Brasil Ltda.). Foram pesados aproximadamente 100 mg de fígado e intestino, o qual foi macerado continuamente em nitrogênio líquido e acrescido de 1 mL de trizol. Transferiu-se o homogeneizado para um microtubo incubando-o por 5 minutos em temperatura ambiente, sob agitação. Após a lise das células, o RNA foi extraído com 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) e centrifugado a 12.000xg por 15

minutos a 4° C. A fase aquosa foi então coletada e adicionada a 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), sendo incubada em temperatura ambiente por 10 minutos agitando a cada três minutos.

O RNA foi então precipitado por centrifugação a 12.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 75%, sendo então centrifugado a 9.500xg por 5 minutos. Em seguida descartou-se o etanol 75% e o sedimento foi incubado em temperatura ambiente para evaporação de todo etanol. Por último, o sedimento foi ressuscitado em 50 µL de água DEPC (água miliq tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato, Invitrogen Brasil Ltda., autoclavada duas vezes) e armazenado a – 80°C.

Amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria, com o uso do acessório µDrop Plate (Modelo Multiskan GO da ThermoScientific). O espectrofotômetro foi previamente zerado em relação à absorbância com 2µL de água (branco), sendo em seguida aplicado sobre o nanocell 2 µL das amostras de RNA (diluídas na proporção de 1: 10 com água DEPC) obtendo-se os valores de absorbância em dois comprimentos de onda: 260 nm e 280 nm.

A concentração de RNA assim como a absorbância e a relação entre A260 e A280 foram expressas automaticamente no espectrofotômetro. A concentração do RNA é obtida da seguinte forma: $[RNA(\mu g/\mu L)] = A \times A_{260} \times \text{diluição}$, onde A é uma constante de cada substância e é definida como a capacidade intrínseca do material analisado de absorver luz em um determinado comprimento de onda. No caso do RNA o valor desta constante é 40. A260 é a leitura da absorbância da amostra no comprimento de onda de 260 nm. Diluição corresponde ao número de vezes que a amostra foi diluída para ser feita a leitura.

4.5.2 Síntese cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen Brasil Ltda). Inicialmente 2 µg de RNA foram tratados com 2 µL de DNase (Invitrogen Brasil Ltda.) e 1 µL de tampão completando o volume com água DEPC até 10 µL. A mistura foi incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente para ação da enzima DNase. Em seguida foi adicionado 1 µL de EDTA para inativação da enzima, deixando a reação durante 8 minutos em banho-maria a 65°C e posteriormente no gelo. Acrescentou-se a mistura 1 µL de oligodT a 100 µM

e 1 µL de dNTPs a 10 µM (Invitrogen Brasil Ltda), sendo em seguida incubada por 5 minutos a 65°C.

Colocou-se novamente a mistura no gelo e foram acrescentados 7 µL do mix (4 µL tampão 5x FF, 2µL de DTT 0,1M e 1 µL de RNase Out). Em seguida, a mistura foi colocada em banho-maria a 37°C acrescentado em cada reação 1 µL de MMLV reverse transcriptase deixando em banho por 1 hora. Para inativar a enzima colocou-se o cDNA a 70°C durante 10 minutos. O cDNA foi quantificado por espectrofotometria, com o uso do acessório µDrop Plate (Modelo Multiskan GO da ThermoScientific). Em seguida o cDNA foi armazenado a – 80°C até a reação de amplificação por PCR em tempo real.

4.5.3. Quantificação dos transcritos por transcrição reversa seguida de PCR em tempo real

Utilizou-se o aparelho AB StepOne Real time PCR System (Applied Biosystems) para execução do experimento. Foi analisada a quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak (2001). A detecção foi realizada pelo Reagente SYBR Green Master Mix (AppliedBiosystems), sendo o gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) utilizado como controle interno para quantificação do gene alvo. As amostras foram analisadas em duas repetições biológicas, quantificadas em corridas independentes, sendo cada amostra avaliada em duplicata em cada placa de reação. Os componentes para cada reação foram 2µL de cDNA, 5,0 µL de 2X SYBR Green Master Mix (AppliedBiosystem) e iniciadores nas concentrações 400 nM.

O teste de eficiência foi realizado em diluições seriadas de 1:10 do cDNA. As reações foram preparadas para se obter um volume final de 0,8µL, sendo constituída de: 2 µL do cDNA; 2,4 µL da mistura dos iniciadores a 2,5 µM (senso e antisenso) e 5 µL do reagente Sybr Green. Os controles negativos (NTC) foram feitos substituindo-se as amostras de cDNA pelo mesmo volume de água na reação. As condições de amplificação para todos os genes foram, 95°C por 20 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 seg e anelamento e extensão a 60°C durante 30 seg. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação.

As amostras foram aquecidas até atingir o limite de 95°C. Sequência de primer (Tabela 2) foram utilizadas para amplificar DMT-1 (Transportador de metal divalente), DcytB (Citocromo duodenal b), ferroportina e hefaestina no duodeno, no fígado foram analisadas os genes ferritina e transferrina. Os níveis de expressão relativa do mRNA foram normalizados pelo controle endógeno gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Todas as etapas foram realizadas usando condições livres de RNase.

Tabela 2- Iniciadores utilizados no PCR em Tempo Real

Nome	Iniciador 1 (5' – 3')	Iniciador 2 (3' – 5')
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Ferritina	CAGCCGCCTTACAAGTCTCT	ATGGAGCTAACCGCGAAGAC
Transferrina	AGCTGCCACCTGAGAACATC	CGCACGCCCTTTATTCATGG
Ferroportina	TTCCGCACTTTTCGAGATGG	TACAGTCGAAGCCCAGGACCGT
DMT-1	CTGATTTACAGTCTGGAGCAG	CACTTCAGCAAGGTGCAA
Hefaestina	GGCACAGTTACAGGGCAGAT	AGTAACGTGGCAGTGCATCA
Dcybt	TGCAGACGCAGAGTTAAGCA	CCGTGAAGTATACCGGCTCC

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

4.6 Análise Estatística

Os grupos animais (n=8) e análise biomolecular (n=5) foram comparados usando análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). A análise estatística foi feita com o programa SPSS Statistics Data Editor versão 19.0 (IBM SPSS Statistics Base, DMSS, SP, Brasil).

4.7 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Protocolo nº 72/2016 em 07/04/2017 (ANEXO A).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição química

A composição química das farinhas das matérias-primas encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3: Composição química dos alimentos testes (100g)

n=3	NE	A	MC	MB	ARR
Energia (Kcal)	294,40±0,70	269,52±0,89	315,50±1,12	231,72±0,26	371,11±1,48
Carboidrato(g)	44,62±0,82	34,48±0,43	75,48±0,37	53,23±0,29	81,23±0,70
Proteína (g)	24,8±0,86	28,64±0,53	3,13±0,01	4,03±0,03	11,48±0,40
Lipídeo (g)	2,00±0,05	1,90±0,17	0,12±0,28	0,30±0,11	0,03±0,05
Cinzas (g)	3,27±0,08	3,51±0,13	2,23±0,05	2,45±0,07	0,37±0,08
Umidade (g)	7,54±0,07	6,14±0,05	10,19±0,09	10,00±0,20	6,54±0,45

NE: NOVA ERA (Feijão caupi convencional); A: ARACÊ (Feijão caupibiofortificado); MC: MANDIOCA CONVENCIONAL; MB: MANDIOCA BIOFORTIFICADA; ARR: ARROZ CONVENCIONAL

Neste estudo houve grande variação quanto aos teores de proteína, carboidrato e umidade entre os dois tipos de feijões. O teor de proteína, lipídeo, cinzas e umidade encontrada nos feijões se mostraram consonante aos teores encontrados na literatura. No estudo de Salvador (2017), também realizado com feijão-caupi, encontraram teores de proteínas (22,87g/100g) e lipídeos (1,95g/100g), semelhantes a esse estudo, o teor de cinzas (1,97g/100g) se mostrou inferior ao encontrado nesse estudo.

Brigide (2002) encontrou em feijões irradiados, de 23,9g/100g de proteína. Assim como Bigonha (2013), no qual avaliaram variedades de feijões biofortificados BRS Agreste e Pontal, e encontraram teores de proteína de 23,40g/100g e 21,01g/100g, respectivamente. Vaz-Tostes et al. (2015) nas variedades BRS Pontal (biofortificado) e Perola (convencional), encontraram teores proteicos de 18,36g/100g e 21,51g/100g, respectivamente. Os teores apresentados estão semelhantes a esse estudo.

As poucas variações nas composições podem ocorrer devido ao local em que foi cultivado e as condições ambientais. De acordo com estudo de Marinho, Pereira e Costa (2001), feijões-caupi tem teor de proteína um pouco maior que os feijões comuns (*Phaseolus vulgaris*), no qual varia de 20 a 30%.

De acordo com Pereira (2014), o teor de proteínas encontrado na linhagem BRS Aracê, em grãos crus, foi de 24,8g/100g, semelhante ao encontrado nesse

estudo, após a cocção em panela de pressão, houve redução no teor de proteína para 13,12g/100g, inferior ao obtido neste estudo. É importante avaliar o teor de proteína, pois pode aumentar a biodisponibilidade de ferro, devido à necessidade dos transportadores de ferro durante a absorção (GERMANO, 2002).

Diniz et al (2001) encontraram teor de cinzas menor nos grãos de feijão (1,77 a 1,27g/100g) em relação a esse estudo. Em relação ao teor de lipídeos, resultados em leguminosas são baixos, assim como o encontrado nesse estudo (1,90 e 2,0g/100g). Tais variações podem ser influenciadas pela linhagem, genótipo, clima e localização em que foi cultivado (SALVADOR, 2017).

Não houve grande variação nos teores de proteína, lipídeo, cinzas e umidade entre os dois tipos de mandioca. O teor de proteína encontrado nas farinhas de mandioca foi superior aos estudos de Feniman, 2004 (0,70g/100g) e Dias e Leonel, 2006 (0,71g/100g). Houve variação entre os teores de carboidratos, a mandioca convencional apresentou maior teor em relação à biofortificada, tal diferença se dá devido ao elevado teor de fibras totais da mandioca biofortificada (Tabela 4).

No arroz, os valores de proteína se encontram acima das concentrações encontradas na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), da mesma forma, os valores de lipídeos são superiores ao encontrado nessa tabela. Podendo ser explicado devido à forma de preparação desse alimento para análise, uma vez que para seu cozimento não foi utilizado nenhum tipo de óleo ou gordura para sua preparação (NEPA-UNICAMP, 2006). Todos os alimentos utilizados sofreram processamento de cozimento, com isso pode haver perdas dos nutrientes (SANTOS, 2016).

Os alimentos contêm compostos que afetam a absorção de Ferro, tanto positivamente quanto negativamente, na Tabela 4 estão expressos os teores de ferro, β -caroteno, compostos fenólicos, fitatos, relação molar fitato/ferro e fibras das matérias-primas.

Tabela 4: Teor de compostos fenólicos, fitatos e fibras dos alimentos testes.

n=3	NE	A	MC	MB	ARR
FITATOS (g/100g)	0,21±0,18	0,29±0,13	0,18±0,05	0,06±0,02	0,02±0,00
FERRO (mg/Kg)	43,83	52,41	5,96	12,33	1,94
RELAÇÃO FITATO/FERRO	4,11	4,73	25,41	4,15	6,98
COMPOSTOS FENÓLICOS (mg ácido gálico/100g)	0,04±0,00	1,42±0,05	0±0,00	0,41±0,1	0±0,00
FIBRA TOTAL(g/100g)	18,09	25,34	-	-	0,36
FIBRA INSOLÚVEL (g/100g)	15,13	19,91	-	-	0
FIBRA SOLÚVEL (g/100g)	2,96	5,43	-	-	0,36

NE: NOVA ERA (Feijão caupi convencional); A: ARACÊ (Feijão caupibiofortificado); MC: MANDIOCA CONVENCIONAL; MB: MANDIOCA BIOFORTIFICADA; ARR: ARROZ CONVENCIONAL

Neste estudo, foram encontrados teores de ferro de 43,83 e 52,41g/100g, em feijões caupi convencional e biofortificados, respectivamente. Moura e Canniatti-Brazaca (2006) realizaram estudo com feijão carioca cozido e obtiveram teor de ferro de 101,3mg/kg, mais elevado do que o encontrado nesse estudo e também Tako et al. (2009) encontraram teores de 78,8 (mg/kg) de ferro em feijões vermelhos.

Barbosa (2015) encontrou valores de 58,75mg/kg de ferro no feijão comum, de acordo com esta pesquisa. Petry et al (2014) encontraram em feijões comuns teores de 54 mg/kg de Fe e em feijões biofortificados 88mg/kg de Fe, valores superiores ao encontrado neste estudo.

Valores inferiores a esse estudo foram encontrados no estudo de Beiseigel et al. (2017) em que feijões carioca biofortificados obtiveram teor de ferro de 48,7 mg/kg de Fe. Outro estudo com feijões biofortificados, BRS Agreste e Pontal, também analisaram o teor de ferro, obtendo resultado superior a este estudo, de 96,4 e 84,6mg/kg de Fe, respectivamente (BIGONHA, 2013).

Correa (2017), encontrou resultados semelhantes a esse estudo, com teores de 66,7 mg/kg de ferro nos feijões convencionais e 57,8 mg/kg nos biofortificados. Teores de ferro de feijões biofortificados foram inferiores ao dos convencionais, ocorrendo o inverso nesse estudo, o que era esperado.

Em análise de feijão fava cozido, Santos (2016) encontrou teores de 21,85 a 38,40mg/kg de Fe, observou-se também a diminuição do ferro em alimentos que foram cozidos em relação ao grão cru.

Além dos fatores antinutricionais, pode haver alteração na composição do alimento, devido ao processo de cocção, reduzindo o teor de minerais, tais como ferro e zinco (SANTOS, 2016).

Vaz-Tostes et al (2015) utilizaram feijão convencional e biofortificado para avaliação de biodisponibilidade de ferro e encontraram teores de ferro semelhantes a esse estudo, 60,52 e 52,43mg/kg de Fe, biofortificado e convencional, respectivamente. Diferente de Pachón et al (2009) que entre feijão biofortificado e convencional, não apresenta diferença significativa.

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) apresenta o teor de ferro em feijão caupi cozido de 11mg/kg de Fe, valores baixos em relação a esse estudo, já o feijão cru, assemelha-se ao teor de Fe desse estudo, 51mg/kg (NEPA – UNICAMP, 2006).

Carvalho et al (2012) avaliaram teores de ferro de raízes de clones de mandioca rosada, encontrando valores entre 4,24 a 7,90mg/kg, resultado similar ao encontrado na mandioca convencional desse estudo. Mezette et al (2009) encontraram em raízes de mandioca cozidas resultado semelhante, com teores de ferro de 6,2 a 10,9mg/kg, a variação ocorreu de acordo com os diferentes genótipos.

Em relação ao teor de ferro do arroz branco, Pereira et al (2009) encontraram média de 14,50 e 5,12mg/kg de ferro em arroz integral e polido, respectivamente, valor superior ao encontrado nesse estudo.

Um componente que reduz a biodisponibilidade do ferro é o fitato, que atua formando complexos insolúveis e com isso diminuindo a absorção (BARRUETO – GONZALEZ, 2008). Brigide (2012) encontrou em feijão comum teor de fitatos de 4,63 a 8,29mg/g.

Beiseigel et al (2017) encontraram teores de fitatos superiores no feijão carioca biofortificado do que no convencional, porém a relação molar fitato:ferro se mostrou maior no feijão comum, fator esse que pode influenciar na absorção desse mineral. Nesse estudo, o teor de fitatos não foi significativamente diferente entre os feijões. Tako et al (2015) também encontraram maior teor de fitatos em feijões

biofortificados, porém devido a quantidade maior de ferro nos biofortificados, a relação fitato:ferro se mostrou maior no feijão convencional.

A razão molar fitato:Fe avalia indiretamente a biodisponibilidade de ferro, quando o resultado é maior que 1 significa que pode haver baixa biodisponibilidade (HALLBERG, BRUNE e ROSSANDER, 1989). Nesse estudo, todos os alimentos foram superiores a 1. Para feijões os valores ficaram entre 4 e 7, exceto a mandioca convencional, em que resultado obtido foi 25,41. De acordo com Correa (2017), a razão molar encontrada para feijões caupi convencional e biofortificado, sugerem que o fitato pode comprometer a biodisponibilidade de ferro.

Um fator que reduz o teor de fatores antinutricionais como fitatos é a cocção. Mosha, Gaga e Pace (1995) notaram reduções de aproximadamente de 30% de fitatos após cozimento em um tempo de 10.

Fitatos podem reduzir a biodisponibilidade de cálcio, magnésio e zinco, pois formam quelatos que diminuem essa absorção (GERMANO, 2002). Porém, além do seu efeito negativo, os fitatos têm importância por ser reserva de fósforo e pelo seu poder antioxidante, atuando reduzindo a formação de radicais livres, prevenindo o surgimento do câncer (NAKAJIMA, 2010; BIGONHA, 2013).

Outro fator que influencia negativamente na absorção de ferro são os compostos fenólicos. Neste estudo os teores de compostos fenólicos das duas variedades de feijão variaram de 0,04 a 1,42 mg/100g. Um dos fatores que aumentam no teor desses compostos são a maceração e a cocção dos grãos, pois com a solubilidade dos compostos fenólicos, os mesmos são liberados (AFONSO, 2010).

Além do teor de ferro, deve ser levado em consideração a sua biodisponibilidade, podendo ser influenciado por diversos fatores, principalmente por outros alimentos presentes na dieta (GERMANO, 2002; HUNT, 2017).

No estudo de Silva, Rocha e Brazaca (2009) foram encontrados teores para compostos fenólicos de $4,51 \pm 0,1$ mg/g e $2,13 \pm 0$ mg/g, do BRS Pontal e Supremo, respectivamente, ambos feijões comuns, superiores aos encontrados nesse estudo. Possivelmente este fator se deve a coloração mais escura do feijão comum em relação ao caupi. Os compostos fenólicos encontram-se na parte que reveste o feijão, chamado tegumento e com isso o teor pode variar dependendo da variedade,

do seu processamento, da maturação, armazenamento, entre outros (BENINGER e HOSFIELD, 1998).

Luthria e Pastor-Corrales (2005) analisaram compostos fenólicos que compõem os feijões, dentre as 15 variedades analisadas, foram detectados, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido sinápico, no qual o teor de compostos fenólicos variou de 19,1 a 49,3 mg/100g.

Silva et al (2014) determinaram teores de compostos fenólicos em 3 variedades de mandioca entre 0,68 até 21,02 mg/g, dentre as variedades branca, amarela e rosada cozidas. Neste estudo, foram encontrados teor médio de 0,41mg de ácido gálico/100g na mandioca biofortificada, na convencional não foram encontrados teores de compostos fenólicos.No arroz não foram encontrados compostos fenólicos na amostra devido à sua coloração clara (arroz polido) e as perdas que ocorridas durante a cocção.

As fibras também podem exercer efeitos negativos na absorção do ferro, ela pode se ligar aos íons de minerais e impedir essa absorção. Além disso, a fibra ao exercer influência do trânsito intestinal, diminuindo o tempo, pode reduzir a absorção de minerais (BERNAUD e RODRIGUES, 2013).No estudo de Bigonha (2013), não foram encontradas relação negativa entre o consumo de fibras e a biodisponibilidade de ferro em animais.

O teor de β -caroteno utilizado como referência nesse estudo, foi de 9 μ g/g, meta dos cultivares da rede de biofortificação BioFORT. Berni (2014) encontrou em mandiocas da linhagem BRS Jari cozidas teores de 6,4 μ g/g, valor inferior ao apresentado pela BioFORT. Também encontrado por Silva et al (2014) em que foram encontrados teores de 2,12 μ g/g em mandioca na variedade branca, e 14,74 μ g/g, na amarela, todas elas após o cozimento.

Nascimento (2006) avaliou teores de β -caroteno em mandioca convencional cozida, e encontrou valores de 2,0 e 2,4 μ g/g. Demonstrando o reduzido valor em relação à mandioca biofortificada.

Redução de teores de carotenóides pró vitamina A podem ser consequência do tempo de exposição ao tratamento térmico que foram submetidas, como por exemplo, à secagem. Como os isômeros cis são suscetíveis à degradação, podem ter havido perdas (NASCIMENTO, 2006).

É de grande relevância compreender que o aumento de β -caroteno não é a única característica que se almeja em um alimento, mas também a sua capacidade de resistir as doenças e seu valor econômico, devido a grande produtividade e boa aceitação no mercado. Sendo assim, a mandioca é considerada um bom veículo de biofortificação (MILLER e WELCH, 2013).

5.2 Ensaio biológico

Houve diferença significativa entre os grupos no ganho de peso, sendo o grupo que continha feijão e mandioca biofortificados, superior aos demais grupos (Tabela 5).

Tabela 5: Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar nos grupos experimentais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS (n=8)	Ganho de peso (g)	Consumo alimentar (g/dia)	CEA
SF	45,41±12,89 ^b	16,17±1,43 ^a	0,20±0,04 ^b
FCMC	59,66±13,74 ^b	16,18±2,15 ^a	0,26±0,04 ^a
FCMB	57,90±15,95 ^b	16,91±2,46 ^a	0,24±0,05 ^{ab}
FBMC	57,66±8,13 ^b	16,61±1,81 ^a	0,25±0,02 ^{ab}
FBMB	79,54±14,92 ^a	17,63±2,05 ^a	0,28±0,05 ^a

SF: Sulfato ferroso; FCMC: Feijão Nova Era+ Mandioca convencional; FCMB: Feijão Nova Era + mandioca biofortificada; FBMC: Feijão Aracê+ Mandioca Convencional; FBMB: Feijão Aracê + Mandioca Biofortificada

CEA: Coeficiente de Eficiência Alimentar

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Essa diferença demonstra que a dieta com alimentos biofortificados supre as necessidades dos animais, fornecendo um ganho de peso com maior eficácia. De acordo com Toaiari et al (2005), essa diferença do ganho de peso se deve pela biodisponibilidade de ferro nas dietas testes. A deficiência de ferro, resultante de longo período de depleção, pode acarretar em uma dificuldade de absorção, ocasionando menor ganho de peso nos animais (BARBOSA, 2015).

Beiseigel et al (2017), avaliaram em pintinhos a biodisponibilidade de ferro em feijões carioca convencionale biofortificados, foi observado que após o período de repleção os pesos corporais foram maiores nos grupos que receberam o feijão biofortificado, e conseqüentemente maior teor de hemoglobina.

Não houve diferença significativa dos grupos controle e testes, para consumo alimentar. O CEA relata a conversão de energia que foi consumida em ganho de peso corporal (SALERNO, 2014).

A dieta é baseada na AIN-93G, em que a recomendação de fibras para os animais são de 50g/kg de dieta, como as matérias-primas já continham teores de fibras, não foi acrescentado celulose, diminuindo assim a interferência das fibras no consumo alimentar, ganho de peso e absorção de ferro. O feijão é um alimento com alto teor de fibras, pois a quantidade é superior a 6g/100g em alimentos sólidos (BRASIL, 1998).

As dietas formuladas foram para fornecer 12mg/kg de ferro, segundo a metodologia AOAC (1998). É de grande importância a realização da eficiência de regeneração de hemoglobina, em que levará em consideração o consumo de ferro e o ganho de hemoglobina (Tabela 6) dos animais de cada grupo.

Tabela 6: Concentração HB inicial, final e ganho de Hb na fase de repleção

GRUPOS EXPERIMENTAIS (n=8)	Hb inicial (g/dL)	Hb final (g/dL)	Ganho Hb (g/dL)
SF	6,25±0,56	8,04±0,84	1,79±1,04
FCMC	6,25±0,52	7,98±1,04	1,73±1,13
FCMB	6,24±0,53	7,99±0,70	1,75±0,74
FBMC	6,26±0,47	8,1±1,18	1,83±1,14
FBMB	6,29±0,46	8±0,93	1,72±0,78

SF: Sulfato ferroso; FCMC: Feijão Nova Era+ Mandioca convencional; FCMB: Feijão Nova Era + Mandioca biofortificada; FBMC: Feijão Aracê+ Mandioca Convencional; FBMB: Feijão Aracê + Mandioca Biofortificada

Hb: hemoglobina;

Médias numa mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

A concentração de hemoglobina da fase de depleção não diferiu significativamente entre os grupos, uma vez que os animais foram agrupados para manter homogênea a média de hemoglobina.

De acordo com o Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (2005), a faixa de hemoglobina normal se dá na faixa de 7,2 a 16g/dL, abaixo desse valor, o animal é considerado anêmico. Então, os animais foram considerados anêmicos ao final do período de depleção e separados em grupos

para que fossem uniformes as faixas em cada grupo para a realização do período de repleção.

Sendo assim, os grupos iniciaram a fase de repleção em condições semelhantes. Todos os animais recuperaram parcialmente da anemia provocada durante o período de depleção. Com isso, foi verificada a relação entre o ganho de hemoglobina e ferro consumido (Tabela 7).

Tabela 7: Teor de ferro consumido/dia, ganho de hemoglobina/ferro consumido, eficiência de regeneração de hemoglobina (HRE) e valor de biodisponibilidade relativo (RBV de HRE).

DIETAS (n=8)	Fe consumido (mg)	Ganho de HB (g/dL) por Fe consumido (g)	HRE (%)	RBV de HRE(%)
SF	2,72±0,24	0,65 ±0,36	51,02 ±19,34	100,0
FCMC	2,72±0,36	0,67±0,48	57,96±14,25	113,60
FCMB	2,84±0,41	0,61±0,25	57,17±13,10	112,05
FBMC	2,79±0,30	0,69±0,47	60,54±17,27	118,67
FBMB	2,96±0,34	0,57±0,25	63,97±18,17	125,39

SF: Sulfato ferroso; FCMC: Feijão Nova Era+ Mandioca convencional; FCMB: Feijão Nova era + mandioca biofortificada; FBMC: Feijão Aracê+ Mandioca Convencional; FBMB: Feijão Aracê + Mandioca Biofortificada

Fe: ferro

HRE: Eficiência de regeneração da hemoglobina

RBV: valor relativo da biodisponibilidade

Médias numa mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05)

A literatura evidencia que a vitamina A auxilia na absorção de ferro, porém nesse estudo não houve diferença significativa (p<0,05) no ganho de hemoglobina por ferro consumido nos diferentes grupos. A eficiência de regeneração de hemoglobina não mostrou diferença significativa entre os grupos, independente da presença de mandioca.

Tako et al (2015) realizaram estudo de biodisponibilidade de ferro em frangos, com feijões carioca, obtiveram resultado significativo na absorção de ferro nos grupos que continham feijões biofortificados em relação ao convencional. Nakajima (2010) utilizou como modelo de avaliação, milho biofortificado com ferro, encontrando biodisponibilidade maior em relação ao grupo controle (sulfato ferroso), exceto um grupo, o Caimbé (15,09mg/kg).

Bigonha (2013) avaliou a biodisponibilidade de feijões biofortificados da cultivar BRS Agreste (84,6mg/kg) e BRS Pontal (96,4mg/kg), não encontrou diferença

significativa entre os feijões em relação ao grupo controle (sulfato ferroso), relatando a eficiência dos feijões na recuperação de hemoglobina.

Um fator que influencia positivamente na avaliação da biodisponibilidade de ferro em ratos, é a capacidade de sintetizar ácido ascórbico, com isso pode haver maior absorção do ferro. Outro fator é a presença da fitase, que aumenta a biodisponibilidade de minerais, devido à capacidade de desfazer os quelatos do fitato com minerais. Apesar desse modelo animal poder superestimar a biodisponibilidade, é vantajoso devido ao fácil manuseio e alocação, além do baixo custo, como também o auxílio na definição de genótipos que podem ser melhorados em programas de biofortificação (CARDENAS, 2006).

A biodisponibilidade de ferro não diferiu entre os grupos quando se avalia o ganho de hemoglobina, isso pode ocorrer devido aos fatores antinutricionais, como fitatos. Estudo com mulheres mostrou através da ingestão de isótopos estáveis de ferro, que a redução de fitatos em feijões comuns, aumenta a absorção de ferro (PETRY et al, 2015).

Murray-Kolb et al. (2017) utilizou o método de depleção/repleção em leitões, com dietas à base de feijões de grãos brancos e vermelhos, não obtiveram diferença significativa na concentração final de hemoglobina entre os grupos. Estudo realizado com porcos, as dietas foram marcadas intrinsecamente com isótopos estáveis, utilizando feijões brancos e vermelhos enriquecidos com ferro e zinco, obtiveram absorção de ferro de 9,8% e 10,9%, respectivamente (TAKO et al, 2009).

Em humanos a biodisponibilidade de ferro, foi avaliada a interação da vitamina A na absorção do ferro, os grupos com e sem vitamina A não foram significativamente diferentes. Observaram diferença quando os alimentos eram ofertados com água ou café, mostrando efeito significativamente maior quando consumidos com água em relação ao café, devido a ação antinutricional dos taninos (WALCZYK et al, 2003).

Arruda et al. (2009) observaram que alimentação deficiente em vitamina A por 57 dias, influencia em menor ganho de peso e maior concentração de hemoglobina nos animais.

5.3 Análises Biomoleculares

Os marcadores biomoleculares do metabolismo do ferro estão mostrados nas Figuras 2a e 2b (fígado) e nas Figuras 3a, 3b, 3c e 3d (intestino).

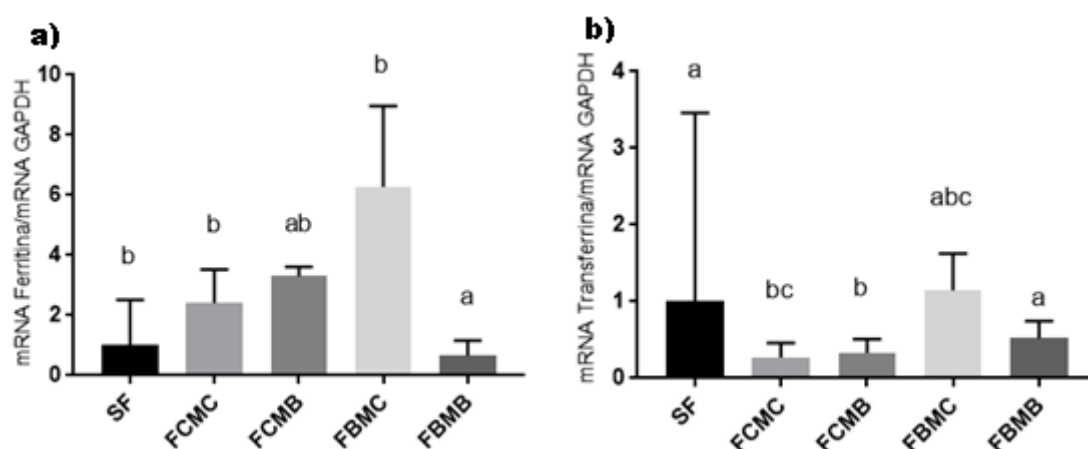
O grupo FBMC ($6,28 \pm 2,68$) teve maior expressão gênica de ferritina no fígado (Figura 2a). Demonstra que ocorreu maior acúmulo de ferro ao organismo, associando-se, possivelmente, ao menor teor de carotenóides pró-vitamina A da mandioca convencional. Inversamente a este resultado, o grupo FBMB ($0,67 \pm 0,5$) apresentou menor expressão gênica, podendo estar associado à atuação da vitamina A na liberação do ferro da reserva hepática. De acordo com Martini (2002), há uma relação inversa na presença de retinol e ferro no fígado. A transferrina tem a função de transportar o ferro no plasma até os locais em que eles serão utilizados pelo organismo (GROTTO, 2008).

Semelhante a esse estudo Tako, Hoekenga e Kochian (2013), utilizando milho biofortificado com ferro, também obtiveram maior expressão de ferritina nos grupos alimentados com amostra biofortificada. A ferritina tem a função desse armazenamento de ferro, quando há excesso de ferro nas células, sendo capaz de evitar danos oxidativos (ARRUDA, 2013).

O transportador transferrina (Figura 2b) foi menos expresso nos grupos que continham feijão-caupi convencional, FCMC ($0,27 \pm 0,19$) e FCMB ($0,33 \pm 0,18$), sugerindo menor liberação de ferro para ser absorvido nos enterócitos. Resultado compatível com a biodisponibilidade encontrada nesse estudo, que houve menor absorção, embora não significativa nos grupos com feijão-caupi convencional, independente a presença de vitamina A.

Dias et al (2015), ao avaliar a expressão gênica de ferritina, encontraram menor expressão de ferritina no fígado dos animais alimentados com feijão biofortificado com ferro (BRS Pontal), sem adição abóbora ou batata-doce biofortificadas com beta-caroteno, contrapondo os resultados do presente estudo.

Figura 2: a) Análise biomolecular de mRNA de ferritina; b) Análise biomolecular de mRNA de transferrina



SF: Sulfato ferroso; FCMC: Feijão Nova Era+ Mandioca convencional; FCMB: Feijão Nova era +mandioca biofortificada; FBMC: Feijão Aracê+ Mandioca Convencional; FBMB: Feijão Aracê + Mandioca Biofortificada

Não houve diferença significativa na expressão de mRNA de DCytB (Figura 3a). Dias et al (2015) encontraram maior expressão de DCytB no grupo que continha feijão biofortificado associado a vitamina A, contrapondo os achados desse estudo.

O transportador de ferro no enterócito, DMT-1, também não diferiu entre os grupos (Figura 3b), embora os grupos com mandioca biofortificada, FCMB ($1,69 \pm 2,67$) e FBMB ($2,06 \pm 0,99$), tenham apresentado numericamente valores superiores ao grupo controle e os grupos que continham mandioca convencional. É possível que o maior teor de carotenoides tenha auxiliado na mobilização do ferro, como apontam os estudos que afirmam o papel da vitamina A no metabolismo do ferro (LAYRISSE, 1997; LYNCH, 1997; SALES, 2012).

Ao analisar os níveis de expressão de DMT-1, Moreira (2009) não encontrou diferença significativa entres os grupos que eram tratados com 35mg de Fe/kg de dieta com e sem vitamina A, sugerindo que a vitamina A não atua diretamente nos níveis de DMT-1.

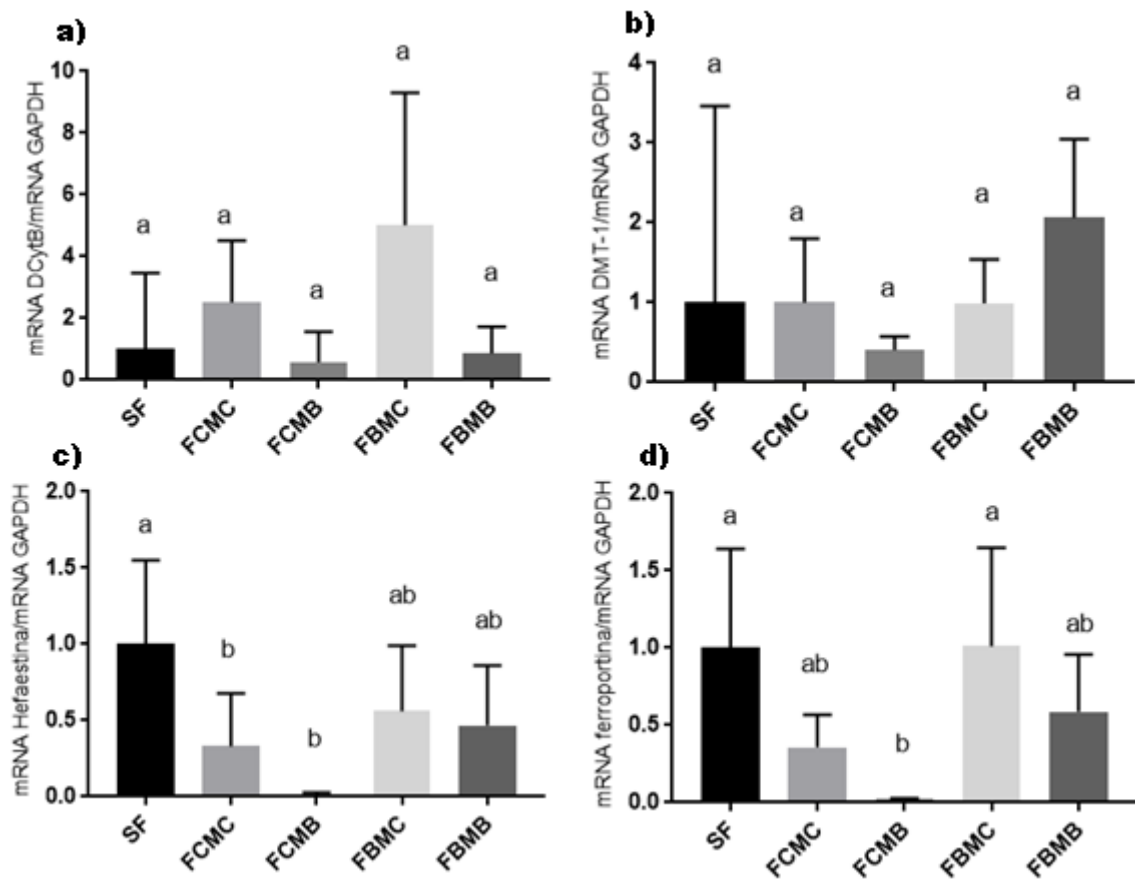
Não houve diferença significativa entre os grupos alimentados com feijão caupi, independente da presença da mandioca biofortificada quanto ao mRNA de hefaestina (Figura 3c). Entretanto, os grupos contendo feijão biofortificado, FBMC ($0,56 \pm 0,43$) e FBMB ($0,47 \pm 0,39$) não diferiram significativamente do controle, com

isso pressupõe-se que houve conversão do ferro ferroso em férrico na membrana basolateral, resultando em maior absorção de ferro nesses grupos. No estudo de Dias et al (2015), por outro lado, a presença de carotenoides na dieta de feijão promoveu maior expressão gênica de hefaestina, observando a influência da vitamina A na absorção do ferro.

Assim como na hefaestina, na análise biomolecular de ferroportina (Figura 3d) os grupos com feijão biofortificados foram mais expressos FBMC (1,01±0,64) e FBMC (0,59±0,37), transportando maior teor de ferro dos interior dos enterócitos para a corrente sanguínea, confirmando a maior biodisponibilidade desses grupos. Inverso foi encontrado por Silva et (2016), encontraram menor expressão de ferroportina no grupo que continha Chia, veículo do maior teor de ferro na dita. No estudo de Dias et al (2015) o maior teor de carotenoides pró-vitamina A na dieta influenciou em indução de ferroportina.

A expressão dessas proteínas depende do estágio de depleção do animal, da ingestão de ferro e da sua biodisponibilidade. Portanto, os valores podem ter sido menores, pois as análises são feitas ao final do experimento, quando os animais já estão com os níveis de hemoglobina recuperados, mesmo que parcialmente essas proteínas estão associadas à compensação da deficiência de ferro no organismo. Como os animais não estavam anêmicos na coleta dos órgãos, podem não relatar a efetiva função desses transportadores (DIAS et al, 2015).

Figura 3: a) Análise biomolecular de mRNA de DCyTB; b) Análise biomolecular de mRNA de DMT-1; c) Análise biomolecular de mRNA de hefaestina; d) Análise biomolecular de mRNA de ferroportina



SF: Sulfato ferroso; FCMC: Feijão Nova Era+ Mandioca convencional; FCMB: Feijão Nova era +mandioca biofortificada; FBMC: Feijão Aracê+ Mandioca Convencional; FBMB: Feijão Aracê + Mandioca Biofortificada

6. CONCLUSÃO

O feijão-caupi biofortificado (BRS Aracê) apresentou um aumento de aproximadamente 19,5% no teor de ferro em relação ao feijão-caupi convencional (BRS Nova era). Paralelamente, o feijão biofortificado apresentou maiores teores de fitatos, compostos fenólicos e de fibras em relação ao convencional. A relação molar fitato/ferro, entretanto, não diferiu entre os feijões-caupi biofortificado e convencional, o que pode ter refletido no ganho de hemoglobina e HRE semelhantes entre os grupos, independente da presença de mandioca com pró-vitamina A.

O feijão-caupi biofortificado com ferro mostrou-se semelhante ao sulfato ferroso quanto à expressão das proteínas hefaestina e ferroportina, sugerindo uma maior eficiência na absorção intestinal de ferro. Por outro lado, o feijão convencional apresentou menor expressão de transferrina quando comparado com o grupo controle, sulfato ferroso, o que indica menor absorção do ferro nesses grupos. A expressão de ferritina no fígado foi menor no grupo alimentado com ambos os alimentos biofortificados (FBMB), o que pode indicar maior mobilização das reservas de ferro hepático na presença de vitamina A. Entretanto, não foi observada diferença entre os grupos quanto às demais proteínas analisadas, DCytB e DMT-1.

Assim, o presente estudo aponta maior eficiência do feijão-caupi biofortificado na biodisponibilidade de ferro, independente da presença da vitamina A. Porém, novos estudos se fazem necessários para verificar a influência da vitamina A na absorção do ferro, levando em consideração os teores de vitamina A fornecidos na dieta e fatores que podem influenciar positivamente ou negativamente nessa interação e absorção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, S. M. E. **Caracterização Físico-Química e Actividade Antioxidante de Novas Variedades de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Dissertação de Mestrado, Bragança – SP, 52f. , 2010.

AMBRÓSIO1 C. L. B.; CAMPOS, F. de A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2,pag. 233-243, mar./abr., 2006.

AOAC, Official Methods of Analysis (14th edn). **Association of Official Analytical Chemists**, Washington, DC,1984.

AOAC, Official Methods of Analysis (16th edn). **Association of Official Analytical Chemists**. Washington D.C.: AOAC, v.2, 1997.

AOAC, Official Methods of Analysis(16th edn). **Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, MD, 1998.

ARREOLA-SIDA, J. P. Biofortificación con micronutrientes en cultivos agrícolas y su impacto en la nutrición y salud humana. **Tecnociencia Chihuahua**. v. 9, n. 2, p. 67-74. Mai/Ago, 2015.

ARRUDA, L. F. **Influência do Teor de Ferro Dietético na Expressão de Genes Reguladores do Metabolismo de Ferro, Estresse Oxidativo e Marcadores do Envelhecimento em Ratos Adultos**. Dissertação de Doutorado em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. Brasília – DF. 99f. 2013.

BARBOSA, C. Z. de M. C. D.**Seleção de linhagens elite de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) para biofortificação de ferro e zinco**.Dissertação Mestrado em Alimentos e Nutrição (PPGAN). Universidade Federal do Piauí (UFPI), 78f , 2015.

BARRUETO-GONZALEZ, N. B. Biodisponibilidade de minerais das fontes leguminosas. **Revista Simbio-Logias**. v.1, n.1, mai, 2008.

BENINGER, C.W.; HOSFIELD, G.L., Flavonol glycosides from the seed coat of a new Manteca-type dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,v. 46, pag. 2906–2910, 1998.

BERNAUDE, F. S.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeito sobre a saúde do metabolismo. Arquivos Brasileiros de **Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n.6, 2013.

BERNI, P. R. de A. **Biodisponibilidade de β -caroteno em mandiocas e batatas-doces biofortificadas: estudo dos efeitos de genótipos e processamentos**. Dissertação de Mestrado. 111f. Piracicaba, 2014.

BEZERRA, D. S. **Avaliação de megadoses de retinol palmitato no pós-parto imediato sobre o retinol do leite de puérperas atendidas no hospital José Pedro Bezerra, Natal-RN.** Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Natal, 2008.

BIGONHA, S. M. **Qualidade protéica e biodisponibilidade de ferro e zinco em feijões biofortificados.** Dissertação de Doutorado, 120f. Viçosa – MG, 2013.

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, pag. 31- 40, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. PORTARIA Nº 27, DE 13 DE JANEIRO DE 1998.** D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de janeiro de 1998.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Carências de micronutrientes. Cadernos de Atenção Básica - nº 20 Série A. Normas e Manuais Técnicos.** Brasília - DF, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da mulher. Dimensões do processo reprodutivo e da Saúde da Criança.** Brasília – DF, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Condutas gerais do programa de suplementação de vitamina A.** BRASÍLIA – DF, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº40 21 de março de 2001. Regulamento técnico para rotulagem obrigatória de alimentos e bebidas embalados.** Anvisa: Brasília, 2001.

BRIGIDE, P. **Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (Phaseolus vulgaris L.) irradiados.** Dissertação de Mestrado, 71f. Piracicaba – SP, 2002.

BUENO, L.; MARCHINI, J. S.; OLIVEIRA, J. E. D. Biodisponibilidade do ferro em formulações nutricionais. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 26, n. 4, pag. 276-280, 2011.

CALLOU, K. R de A.; SILVA, M. C. F. Biodisponibilidade de micronutrientes e compostos bioativos: Aspectos atuais. **Revista eletrônica**, v. 1, n. 1, julho, 2016.

CARDENAS, L. L. A R. **Biodisponibilidade de zinco e ferro , valor nutricional e funcional de diferentes cultivares de feijão comum submetidos a tratamentos domésticos.** Dissertação de Doutorado, 189f. Viçosa – MG, 2006.

CARVALHO, C. de A.; CORGUINHA, A. P. B.; SOUZA, G. A.; PEREIRA, F. G.; FAGUNDES, T. G. VIEIRA, E. A.; FIALHO, J de F.; GUILHERME, L. R. G. Teor de Ferro e Zinco em Raízes de Clones de Mandioca Rosada Visando Programas de Biofortificação. **Fertbio**, 2012.

CARVALHO, J. L. V. de; NUTTI, M. Biofortificação de produtos agrícolas para nutrição humana. **Anais da 64ª Reunião Anual da SBPC**. São Luís, MA. Julho, 2012.

CARVALHO, L. C. B.; SILVA, K. J. D.; ROCHA, M. DE M. FRANCO, L. J. D.; SILVA, L. R. A.; CARVALHO, J. S. dos S.; SOUSA, M. B.; PIRES, C de J. **Obtenção de populações de feijão-caupi visando a biofortificação para os teores de ferro, zinco e proteína**. Teresina – Piauí, 2011.

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, 2010

CASTRO, A. H. F. et al. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 385-390, mar./abr. 2009

CEBALLOS, H.; LUNA, J.; ESCOBAR, A. F.; ORTIZ, D.; PEREZ, J. C.; SANCHEZ, T.; PACHON, H.; DUFOUR, D. Spatial distribution of dry matter in yellow fleshed cassava roots and its influence on carotenoid retention upon boiling. **Food Research International**, v.45, p. 52-59, 2012.

CORREA, S. R. **Biodisponibilidade de ferro in vitro e in vivo de mistura de feijões caupi e batata doce biofortificados**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Espírito Santo. 65f, 2017.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de minerais. **Revista Nutrição. Campinas**, v.10, n 2, pag. 87-98, jul./dez., 1997.

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.

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.

DIAS, L. T.; LEONEL, M. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 692-700, jul./ago., 2006.

DINIZ, M. C.; DA SILVA, C. L.; ARAGÃO, N.L.L.; BARBOSA MUNIZ, M.; FERREIRA, G. M.; DE OLIVEIRA, M.R.T. Caracterização química e tecnológica de 4 variedades de feijão macasar verde (*vigna unguiculata* (L.) walp) comercializadas e consumidas no município de campina grande – Pb. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.3, n.1, p. 91-100, 2001.

EMBRAPA. Cultivar de feijão-caupi com grãos verde-oliva e rica em ferro e zinco. **Embrapa Meio-Norte**. Teresina – PI, 2009.

FAO/IFAD/WFP-FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **International Fund for Agricultural Development. World Food Programme. The state of the food insecurity in the world. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress.** 2015.

FENIMAN, C. M. **Caracterização das raízes de mandioca (Manihot esculenta Crantz) do cultivar IAC 576-70 quanto à cocção, composição química e propriedades do amido em duas épocas de colheita.** Dissertação de Mestrado. 99f. Piracicaba - SP, 2004.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K.; DAMODARAN, S. **Food Chemistry.** 4^a ed. Boca Raton: RC Press, 2008.

FERNANDES, A. C.; NISHIDA, W.; PROENÇA, R. P. da C. Influence of soaking on the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cooked with or without the soaking water: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 2209–2218, 2010.

FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V. Q.; RAMOS, S. R. R.; MACHADO, C. de F. Novo gene produzindo cotilédone verde em feijão-caupi. **Rev. Ciên. Agron.**, Fortaleza, v.38, n.3, p.286-290, Jul./Set., 2007.

FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório.** Salvador, 2005

GERMANO, R. M. A. **Disponibilidade de ferro na presença do β -caroteno e o efeito dos interferentes em combinações de alimentos.** Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 111f. Piracicaba – SP, 2002.

GONÇALVES, A. S. F.; GONÇALVES, W. M.; SILVA, K. M. de J.; OLIVEIRA, R. M. Uso da biofortificação vegetal: uma revisão. **Revista do Centro Universitário de Patos de Minas.** Patos de Minas - UNIPAM. n. 6, p. 75-87, 2015.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 2, pag. 8-17, 2010.

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

HALLBERG, L; BRUNE, M.; ROSSANDER, L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 49, n.1, pag. 140-144, 1989.

HARO-VICENTE, J.; PÉREZ-CONESA, D.; RINCÓN, F.; ROS, G.; MARTÍNEZ-GRACIÁ, C.; VIDAL, M. Does ascorbic acid supplementation affect iron bioavailability

in rats fed micronized dispersible ferric pyrophosphate fortified fruit juice? **European Journal of Nutrition**, v. 47, n.8, p. 470-478, 2008.

HE, X. T.; LOGAN, T. J.; TRAINA, S. J. Physical and chemical characteristics of selected U.S. municipal solid waste composts. **Journal of Environmental Quality**, v. 24, p. 543–552, 1995.

HUNT, J. R. Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. **American Journal of Clinical Nutrition**, V.78, 2003.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Vitamin A. In: Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary references intake for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc.** Washington (DC): Nacional Academy Press; p.82-161, 2001.

LATTA, M. ESKIN, J. J. **Agric. Food Chem.**, v. 28, pag. 1313–1315, 1980.

LAYRISSE, M.; GARCIA-CASAL, M. N.; SOLANO, L.; BARON, M. A.; ARGUELLO, F.; LLOVERA, D.; RAMÍREZ, J.; LEETS, I.; TROPPER, E. The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: preliminary results. **Journal Nutrition Biochemistry**. v.8, pag. 61-67, 1997.

LIMA, A. B. de M. **Níveis de retinol e fatores associados à sua deficiência em estudantes de Teresina, Piauí.** Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição. Teresina – PI, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGENT, T. D. Analysis of relative gene expression Data using real time quantitative PCR and the 2^{-2DDCT} Method. **Ideal Library**, pag. 402-408, 2001.

LUTHRIA, D.L.; PASTOR-CORRALES, M.A.,. Phenolic acid content of fifteen dry edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, pag.. 205-211. 2005.

LYNCH, S. R. Interaction of iron with other nutrients. **Nutrition Reviews**. v. 55, n. 4, p 102-110, 1997.

MALTA, D. C.; SANTOS, M. A. S.; ANDRADE, S. S. C. de A.; OLIVEIRA, T. P.; STOPA, S. R.; OLIVEIRA, M. M.; JAIME, P. Tendência temporal dos indicadores de excesso de peso em adultos nas capitais brasileiras, 2006-2013. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 21, n 4, p. 1061-1069, 2016.

MARINHO, J.T.S.; PEREIRA, R.C.A.; COSTA, J.G. Caracterização de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) em plantios no Acre. EMBRAPA ACRE. **Boletim de Pesquisa**, n. 31, set. 2001.

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.

MARTINI, F. C. C. **Comparação entre a biodisponibilidade de ferro na presença de vitamina A e beta-caroteno em alimentos e medicamentos.** Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Piracicaba- SP, 2002.

MEZETTE, T. F.; CARVALHO, C. R. L.; MORGANO, M. A.; SILVA, M. G.; PARRA, E. S. B.; GALERA, J. M. S. V.; VALLE, T. L. Seleção de clones-elite de mandioca de mesa visando a características agronômicas, **EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Região de adaptação. Teresina, PI, v.68, n.3, p.601-609, agosto, 2009.

MILLER, D. D.; WELCH, R. M. Food system strategies for preventing micronutrient malnutrition. **Food Policy**, Oxford, v.42, p 115-128, 2013.

MOREIRA, D. dos S. **Deficiência de vitamina A e níveis de transcrito de transportadores de ferro no intestino de ratos.** Dissertação de Mestrado em Nutrição Humana. Brasília. 107f, 2009.

MOSHA, T. C.; GAGA, H. E.; PACE, R. D. Effect of blanching on the content of antinutritional factors in selected vegetables. **Plant of foods Human Nutrition**. V. 47, p. 361-367, out, 1995.

MOURA, F. F. de. Are Biofortified Staple Food Crops Vitamin A and Iron Status in Women and Children? New Evidence from Efficacy Trials. **American Society for Nutrition. Advances in Nutrition**. v. 5, p. 568–570, 2014.

MOURA, L. S. de M. Propriedades de absorção e solubilização de extrudados de farinha mista de feijão, milho e arroz biofortificados. **IV Reunião de Biofortificação**. Teresina, Piauí, 2011.

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**, Campinas, v.26, n. 2, pag. 270-276, abr./jun, 2006.

MURRAY-KOB, L. E.; WENGER, M. J.; SCOTT, S. P.; RHOTEN, S. E.; LUNG'AHU, M. G.; HAAS, J. D. Consumption of Iron-Biofortified Beans Positively Affects Cognitive Performance in 18- to 27-Year-Old Rwandan Female College Students in an 18-Week Randomized Controlled Efficacy Trial. **The Journal Nutrition**, Out, 2017.

NAKAJIMA, V. M. **Biodisponibilidade de ferro de genótipos de milho: Avaliação por métodos in vitro e in vivo.** Dissertação de Mestrado em Ciência da Nutrição. 83f. Viçosa, 2010.

NASCIMENTO, P. **Avaliação da retenção de carotenóides de abóbora, mandioca e batata doce.** Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência dos alimentos. São José do Rio preto. 79f, 2006.

NEPA-UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimento**. 2. ed. -- Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 113p., 2006.

NETTO, M. P.; PRIORE, S. E.; FRANCESCHINI, S. do C. C. Interação entre vitamina A e ferro em diferentes grupos populacionais. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife. v. 7, n. 1, p. 15-22, jan/ mar, 2007.

NEVES, A. C.; CÂMARA, J. A. S.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; SOBRINHO, C. A. Cultivo do feijão-caupi em sistema agrícola familiar. Teresina: **Embrapa Meio-Norte**, 15p. 2011.

OLIVEIRA, D. G. **Seleção simultânea para produção, biofortificação e culinária em populações segregantes de feijão-caupi**. Dissertação Mestrado em Genética e Melhoramento. Teresina, Piauí, 2014.

PACHON, 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** v. 74, n. 5, 2009.

PEREIRA, E. J. **Estudo da composição em macronutrientes, retenção e bioacessibilidade de ferro e zinco em cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L Wap) em grãos crus e após o cozimento**. Dissertação de Doutorado. 115f. Rio de Janeiro, 2014.

PEREIRA, J. A.; BASSINELLO, P. Z.; CUTRIM, V dos A.; RIBEIRO, V. Q. Comparação entre características agrônômicas, culinárias e nutricionais em variedades de arroz branco e vermelho. **Revista Caatinga**, v.22, n.1, p.243-248, jan/mar, 2009.

PETRY, N.; EGLI, I. E.; GAHUTU, J. B.; TUGIRIMANA, P. L. BOY, E.; HURRELL, R. Phytic Acid Concentration Influences Iron Bioavailability from Biofortified Beans in Rwandese Women with Low Iron Status. **The Journal of Nutrition**, 2014.

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 Biofortification¹. **The Journal of Nutrition**, p. 492- 497, 2015.

PHORBEE, O. O.; OLAYIWOLA, I. O.; SANNI, S. A. Bioavailability of Beta Carotene in Traditional Fermented, Roasted Granules, Gari from Bio-Fortified Cassava Roots. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, pag. 1247-1254, 2013.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; STRINGHETA, P. C.; BRANDÃO, S. C. C.; AZEREDO, R. M. C. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1-2, p. 145-151, 1998.

QUEIROZ, D. Deficiência de vitamina A em crianças do estado da Paraíba, Brasil: perfil epidemiológico e associação com índices antropométricos. Campina Grande (Dissertação Mestrado em Saúde Pública), 73f., 2011.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, J. R. G. C., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**. v.123, p.1939–195, 1993.

ROCHA, M. de M.; FREIRE FILHO, F. R.; SILVA, K. J. D.; BARRETO, A. L. H.; FRANCO, L. J. D.; SANTOS, A. M. F.; NUTTI, M. R.; CARVALHO, J. L. V. Biofortificação do feijão-caupi no Brasil: estado atual e perspectivas. **3ª Reunião Anual de Biofortificação no Brasil** – Aracaju – SE, 2009.

RODRIGUEZ, D. B. et al. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Annals of Botany**, Rome, v.40, p.615-624, 1976.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v.76, pag. 735–750, 2015.

SALERNO, P. S. V. **Efeito da dieta de cafeteria em ratos submetidos ao Estresse Crônico Variado: análise de parâmetros bioquímicos e comportamentais**. Dissertação de Mestrado em Nutrição e Alimentos, Pelotas. 89f. 2014.

SALES, M. C. **Marcadores Bioquímicos do Estado Nutricional do Ferro, Vitamina A e Zinco: Interação e Influência dos processos clínicos infecciosos subclínicos**. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública. Campina Grande, 2012.

SALVADOR, B. C. **Biodisponibilidade de peptídeos do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e o metabolismo do colesterol**. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública. São Paulo, 2017.

SANTOS, M. M. A. **Avaliação da biodisponibilidade de Cu, Fe e Zn em feijão - fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. Dissertação de Mestrado em Química. 65f. Teresina, Piauí, 2016.

SHARMA, P.; DWIVEDI, S.; SINGH, D. **Global poverty, hunger, and malnutrition: a situational analysis**. In: SING, U.; PRAHARAJ, C.S.; SINGH, S.S.; SINGH, N.P (ed.). Biofortification of food crops. New Delhi: Springer, p. 19-30, 2016.

SILVA, A. G. M. **Avaliação da qualidade de alimentos biofortificados produzidos em sistemas agroecológicos do trópico úmido**. Dissertação de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos. São José do Rio Preto – SP, 2016.

SILVA, A. G.; ROCHA, L. C.; BRAZACA, S. G. C. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)*. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.4, p. 591-598, out./dez. 2009.

SILVA, L. L. S. **Estado nutricional de vitamina a em crianças de unidades básicas de saúde de Goiânia-GO**. Dissertação de Mestrado em Nutrição e Saúde. Goiânia, 2014.

SILVA, R. M. G.; FIGUEIREDO, P. A.; PEIXOTO, E. C. T. de M.; SILVA, L. P. Atividade antioxidante e determinação de fenóis totais, carotenoides, betacarotenos, licopeno e zinco em variedades branca, amarela e rosada de *Manihot esculenta* Crantz. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 556-564, Mar./Apr. 2014

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology** journal. p. 152-178, 1999.

TAKO, E. GLAHN, R. P.; LAPARRA, J. M.; WELCH, R. M.; LEI, X.; KELLY, J. D.; RUTZKE, M. A.; MILLER, D. D. Iron and Zinc Bioavailabilities to Pigs from Red and White Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Are Similar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, pag.3134–3140, 2009.

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*). **Nutrition Journal**, 2013.

TAKO, E.; REED, S. ANANDARAMAN, A.; BEEBE, S. E.; HART, J. J.; GLAHN, R. P. Studies of Cream Seeded Carioca Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from a Rwandan Efficacy Trial: In Vitro and In Vivo Screening Tools Reflect Human Studies and Predict Beneficial Results from Iron Biofortified Beans. **Plos one**, set, 2015.

TOAIARI, S. D. A.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; SOUZA, R. F. S. Biodisponibilidade de ferro do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e da farinha de mandioca fortificada com ferro em ratos. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 3, pag.291-299, maio/jun., 2005.

VAZ-TOSTES, M. das G.; VEREDIANO, T. A.; MEJIA, E. G.; COSTA, N. M. B. Evaluation of iron and zinc bioavailability of beans targeted for biofortification using *in vitro* and *in vivo* models and their effect on the nutritional status of preschool children. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2015.

VELLOZO, E. P.; FIRBERG, M. A contribuição dos alimentos fortificados na prevenção da anemia ferropriva. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. V.32, n.2, 2010.

WALCZYK, T.; DAVIDSSON, L.; ROSSANDER-HULTHEN, L.; HALLBERG, L.; HURRELL, R. F. No enhancing effect of vitamin A on iron absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**; v. 77, pag.144–9, 2003.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Indicators for assessing Vitamin A Deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes: report of a joint**. Geneva: WHO/UNICEF, 1996.

ZARTARIAN, Mariana Braga Aguiar. **Revisão de literatura abordando os diversos aspectos da anemia ferropriva na infância.** 2014. 28 f. Monografia de Farmácia. Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2014.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética


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 do Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/CCS/UFPES