



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES EM
MULTIMISTURAS ACRESCIDAS DE *Spirulina platensis***

NUTRICIONISTA PAULA LOBO MARCO

**Prof.^a Dr.^a Leonor Almeida de Souza Soares
ORIENTADORA**

**RIO GRANDE, RS
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES EM
MULTIMISTURAS ACRESCIDAS DE *Spirulina platensis***

Dissertação apresentada para obtenção do
Título de Mestre em Engenharia e Ciência de
Alimentos ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia e Ciência de Alimentos, da Universidade
Federal do Rio Grande.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leonor Almeida de
Souza Soares.

**RIO GRANDE, RS
2008**

AGRADECIMENTOS

À FURG, pela oportunidade de aprimoramento profissional e pessoal oferecido através deste curso.

A todos os professores do programa, que contribuíram com novos conhecimentos, em especial à professora Eliana Badiale Furlong pela ajuda, dicas sempre valiosíssimas e presteza durante grande parte da realização do curso; além da possibilidade de utilização de todos os recursos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos.

À minha querida professora e orientadora Leonor Almeida de Souza Soares, um ser humano singular, muito obrigada pela colaboração, força, carinho, amizade e (muita) paciência durante cada etapa do desenvolvimento deste trabalho.

A minha mãe, pai e irmão pelo apoio incondicional e incentivo além da valiosa ajuda, me acompanhando inclusive durante a execução deste trabalho usando seus tempos disponíveis para me ajudar com elaboração de dietas, limpeza e outras diversas tarefas durante o experimento biológico.

A todo “pessoal” do laboratório pelas experiências compartilhadas. Minha muitíssimo obrigada à Vivian Feddern por toda ajuda prestada; aos colegas William Vega, Vânia Recart e Michele de Souza pela amizade e companheirismo, sem vocês seria tudo mais difícil. Obrigada aos alunos de graduação em Engenharia de Alimentos Vânia, Walesca, Anderson, Vanessa e Bruninha pelo indispensável auxílio.

Aos responsáveis e técnicos, especialmente Jesus Lamego e Maria, dos laboratórios que permitiram e auxiliaram no uso de seus equipamentos.

A toda “família emprestada” que ganhei em Rio Grande; cunhada e sogros, obrigada por tudo.

Às alunas do curso de Nutrição da UFPel Sheila, Luciana e Kellen e ao médico veterinário Rafael Tavares por todo o auxílio durante o experimento biológico. Muito obrigada à farmacêutica e bioquímica Andrea Rocha pelas análises laboratoriais; à

faculdade de Nutrição em nome da diretora Márcia Buchweitz pela liberação do espaço para realização dos experimentos; à professora Rosane Rodrigues por toda a presteza e ajuda.

À Prof^a. Iná dos Santos por ter gentilmente cedido um equipamento precioso para os resultados deste trabalho.

Ao meu namorado Marlos, que esteve comigo em todos os momentos e sem o qual não seria possível chegar até aqui. Teu apoio foi fundamental, obrigada por tudo.

À banca, pela participação e sugestões.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VII
– CAPÍTULO I –.....	VIII
RESUMO GERAL	VIII
ABSTRACT GERAL	VIII
INTRODUÇÃO GERAL.....	VIII
RESUMO	IX
INTRODUÇÃO.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Estudos desenvolvidos na Universidade Federal do Rio Grande	3
2.2 Estudos desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica de Alimentos	4
3. OBJETIVOS.....	6
3.1 Geral:.....	6
3.2 Específicos:	6
4. JUSTIFICATIVA	7
– CAPÍTULO II –.....	9
5. REVISÃO DE LITERATURA	10
5.1 Multimistura	10
5.2 Formulações de multimistura	11
5.3 Ingredientes da multimistura.....	12
5.3.1 Farelos	12
5.3.2 Farinhas	14
5.3.3 Sementes.....	14
5.3.4 Folha de mandioca	14
5.3.5 Casca de ovo	15
5.4 <i>Spirulina platensis</i>	15

5.5 Legislação	17
5.5.1 Legislação para Multimisturas	17
5.5.2 Legislação para Spirulina	18
5.6 Estudos Realizados com Multimistura	19
5.6.1 Multimistura na dieta de crianças	19
5.6.2 Multimistura na dieta de ratos.....	21
5.7 Ferro: Importância e funções	26
5.8 Formas químicas e absorção do ferro	27
5.8.1 Fatores dietéticos inibidores da absorção	29
5.8.2 Fatores dietéticos promotores da absorção do ferro	29
5.9 Biodisponibilidade de ferro	30
5.10 Deficiência de ferro	31
5.11 Proteínas	32
5.12 Avaliação da qualidade das proteínas	32
5.12.1 Métodos Biológicos.....	33
5.12.1.1 Balanço de Nitrogênio (BN).....	33
5.12.1.2 Digestibilidade <i>in vivo</i>	33
5.12.1.3 Utilização Líquida de Proteína (NPU)	34
5.12.1.4 Valor Biológico.....	35
5.12.1.5 Quociente de Eficiência Protéica (PER).....	35
5.12.1.6 Quociente de Eficiência Líquida de Proteína (NPR)	36
5.12.1.7 Coeficiente de Eficiência Alimentar (FER)	37
– CAPÍTULO III –	38
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	38
CAPÍTULO III – ARTIGO 1:	39
BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E ÍNDICES BIOQUÍMICOS DE RATOS ALIMENTADOS COM MULTIMISTURAS ACRESCIDAS DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>	39
CAPÍTULO III – ARTIGO 2:	50
APÊNDICE 1 – MISTURAS MINERAL E VITAMÍNICA	63
Mistura de minerais para adição à dieta padrão segundo AIN-93 Growth.....	63
Mistura vitamínica recomendada para utilização com as formulações das dietas AIN-93G e AIN-93M.*	64
APÊNDICE 2 – VERSÃO DO ARTIGO 1 SUBMETIDO AO PERIÓDICO “INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY” .	65

– CAPÍTULO IV –	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores nutritivos por porção de 45g (3 colheres de sopa cheias)	11
TABELA 2. Recomendações diárias de ferro (mg/dia) por faixa etária.....	27

– CAPÍTULO I –
RESUMO GERAL
ABSTRACT GERAL
INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO

A anemia ferropriva é a forma mais grave de carência de ferro, sendo a deficiência nutricional mais comum encontrada no mundo. As misturas à base de farelos de cereais ou multimisturas (MM) têm sido uma alternativa para fornecer nutrientes a populações infantis de baixa renda, visando a promoção de um crescimento adequado, a prevenção e tratamento da anemia, diminuição de diarreia, etc. O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia de diferentes composições de multimistura na biodisponibilidade de nutrientes como ferro e proteína através de ensaio biológico. Foram formuladas 2 MM com adição da microalga *Spirulina platensis* diferindo quanto ao tipo de farelo (trigo ou arroz); uma MM conforme preconizado pela Pastoral da Criança; uma dieta controle à base de caseína; outra semelhante à controle porém deficiente em ferro e uma aprotéica. Inicialmente os 48 animais foram divididos em 2 grupos de 24 ratas cada, um para depleção de ferro e outro para depleção de proteína. Após este período, foram divididas em grupos de 6 animais segundo o tipo de dieta ofertada: controle (caseína); MM com farelo de arroz e *Spirulina* (MAS); MM com farelo de trigo e *Spirulina* (MTS) e MM Pastoral da Criança (MPC). As rações foram administradas durante 21 dias e, ao final deste período, os animais foram sacrificados para análise de índices bioquímicos, hemograma e relação dos órgãos com peso corporal. As rações foram avaliadas nutricionalmente através do coeficiente de eficiência alimentar (FER), razão de eficiência líquida protéica (PER), coeficiente de utilização líquida de proteína (NPR) e digestibilidade verdadeira *in vivo* (DV). Foi realizada análise de variância em todos os resultados, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados desse estudo demonstraram que as ratas que se alimentaram das MM com farelo de arroz apresentaram maior ganho de peso do que as que ingeriram MM com farelo de trigo. As dietas com *Spirulina* também causaram maior ganho de peso que a MM sem a microalga. Todos os índices bioquímicos testados encontraram-se dentro da normalidade para a espécie e não diferiram entre os grupos. Como era esperado, a DC apresentou maiores valores de FER, PER, NPR e DV que as MM, e dentre essas, as dietas MAS e MTS tiveram valores mais elevados desses indicativos biológicos que a MPC, indicando que a adição da *Spirulina* aumentou a qualidade nutricional dessas MM.

Palavras-chave: Farelos. Biodisponibilidade de nutrientes. Ratos *Wistar*. Alimentação alternativa. Alga.

ABSTRACT

Iron deficiency anemia is the most serious iron deficiency and the commonest nutritional need worldwide. Cereal-oat-based mixtures or multimixes (MM) have been considered as alternatives to supply nutrients to low-income infant populations, to promote adequate growth, prevent and treat anemia, fight diarrhea, etc. The aim of this study is to evaluate by a biological assay the efficacy of different multimixes formulations with respect to the nutrients bioavailability such as iron and protein. Two MM were produced including the microalgae *Spirulina platensis* distinct only from the bran used (wheat or rice); one MM as suggested by the Child Pastoral; a control casein-based diet; another similar to control but lacking iron and a protein free diet. First the 48 animals were split into two groups of 24 female rats each, one group followed iron depletion and the other protein depletion. Then, six-animal groups were created according to the diet they were fed: control (casein); rice bran plus *Spirulina* MM (MAS); wheat bran plus *Spirulina* MM (MTS) and Child Pastoral MM (MPC). Animals were fed during 21 days and, later they underwent euthanasia to run biochemical analyses, hemogram and to assess the organ/bodyweight ratio. Diets were evaluated nutritionally by the food efficiency ratio (FER), protein efficiency ratio (PER), net protein ratio (NPR) and *in vivo* digestibility (DV). Analysis of variance was carried out for all results and mean values were compared by Tukey's test ($p < 0.005$). The results showed that rats fed with rice-bran MM presented higher weight gains than those fed with wheat-bran MM. Diets containing *Spirulina* also resulted in higher weight gains compared to *Spirulina* free diets. All biochemical parameters tested were within normal range for the species and were no different between groups. As expected, DC presented higher FER, PER, NPR and DV than MM diets, and within MM diets, MAS and MTA resulted in higher levels of these biological parameters than MPC, pointing out to a conclusion that the addition of *Spirulina* improved the MM nutritionally.

Key-words: Bran. Nutrient bioavailability. Wistar rats. Alternative foods. Algae.

INTRODUÇÃO

A anemia por deficiência de ferro – anemia ferropriva – é a mais comum carência nutricional encontrada no mundo e afeta tanto países desenvolvidos como em desenvolvimento (WHO, 2001). Crianças e mulheres em idade fértil, incluídas as gestantes, são os grupos que têm maior risco (NEUMAN et al., 2000). No Brasil, 35% das crianças de 1 a 4 anos têm anemia, o que significa quase 5 milhões de crianças anêmicas apenas nesta faixa etária (MORA & MORA, 1997).

Um dos principais fatores que contribuem para a alta prevalência de anemia é a alimentação inadequada, com ingestão precoce de leite de vaca e alimentos sólidos pobres em ferro, ingestão freqüente e excessiva de chá, baixa ingestão de carne e vitamina C. O aleitamento materno por mais de 6 meses sem suplementação de ferro além da baixa biodisponibilidade de ferro nos alimentos que compõem a dieta também colabora para a manutenção deste quadro na infância (LOZOFF et. al., 2000).

A anemia está associada a risco aumentado de morte por doenças relacionadas à desnutrição, retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da imunidade celular, problemas de comportamento e diminuição da capacidade intelectual (GIUGLIANI & VICTORA, 1997; STOLTZFUS, 2001; LOZOFF et. al., 2000).

Com o intuito de aumentar o valor nutricional da dieta e diminuir o quadro de desnutrição, os Drs. Clara e Rubens Brandão iniciaram, em 1976 no Pará, o uso de uma mistura de alimentos não convencionais na dieta, como farelos e folhas verde-escuras. A partir da década de 80, algumas entidades governamentais e não governamentais como a Fundação Nacional de Saúde e a Pastoral da Criança (CNBB), passaram a utilizar a alimentação alternativa e obtiveram uma diminuição no quadro de desnutrição no Brasil (BITTENCOURT, 1998).

Em 2000 foi criado o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade a que deve obedecer a Mistura à Base de Farelo de Cereais. Neste regulamento, foi definido que multimistura deve ser um produto obtido através da secagem, torragem, moagem e mistura de ingredientes de origem vegetal, sendo obrigatória a presença de farelos torrados em quantidade mínima de 70% (g/100g) e pó de folhas verde-escuras, podendo ser adicionados leite em pó e outros ingredientes (BRASIL, 2000).

A composição da multimistura varia de acordo com a disponibilidade regional de ingredientes, sendo geralmente composta de farelos de cereais como arroz e trigo, pó de casca de ovo e de folhas verde-escuras como mandioca, beterraba, cenoura, além de sementes moídas como as de girassol ou abóbora.

Devido ao seu conteúdo protéico, em torno de 15% (LEITE et. al.,2002), e ao baixo custo, a multimistura vem sendo utilizada na alimentação de crianças visando a promoção de um crescimento adequado, a prevenção e tratamento da anemia, diminuição de diarreia e doenças respiratórias e manutenção da saúde em geral.

Porém, alguns ingredientes presentes na multimistura apresentam substâncias consideradas tóxicas e/ou antinutricionais, tais como ácido cianídrico e ácido fítico, que podem impedir a absorção de nutrientes pelo organismo. Por esse motivo e pela falta de comprovação científica quanto a sua eficácia, sua utilização tem sido bastante controversa. Os estudos chamam a atenção para os fatores antinutricionais e tóxicos, semelhança de valor nutricional entre os ingredientes, baixa biodisponibilidade dos nutrientes além de aspectos de conservação e contaminação microbiológica (VIZEU et al., 2005; BITTENCOURT, 1998; DOMENE, 1996).

Contemplando co-produtos regionais, neste trabalho foram avaliadas diferentes composições de multimisturas acrescidas da microalga *Spirulina platensis*, com o objetivo de analisar a biodisponibilidade de nutrientes destas. Foram utilizados ratos *Wistar* como modelo biológico para o estudo das respostas nutricionais.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudos desenvolvidos na Universidade Federal do Rio Grande

Foram realizados alguns estudos sobre a multimistura na Faculdade de Enfermagem dessa instituição.

Fonseca e Gomes (1999) executaram um programa de recuperação do crescimento de crianças de zero a cinco anos de uma creche da periferia do Rio Grande, através de cursos sobre preparo e utilização da multimistura. Eles verificaram, após dois meses de utilização da multimistura, diminuição no número de casos de diarreia e de problemas respiratórios, além de significativa diminuição no quadro de desnutrição.

Veleda (2004) fez uma avaliação de um programa de suplementação alimentar com multimistura por meio de acompanhamento do crescimento de crianças na faixa etária de 6 meses a 7 anos residentes numa comunidade do Rio Grande. Entre as crianças que receberam multimistura, 69,8% tiveram aumento de peso; os 17% restantes constituiu as crianças que utilizaram o complemento por um período muito curto ou que compareceram a apenas uma pesagem. Das crianças que não utilizaram a multimistura, 77,7% aumentaram de peso durante o período acompanhado (12 meses), enquanto que dentre as crianças que utilizaram a multimistura, 69,8% aumentaram de peso. Houve melhora do índice peso/idade na maioria das crianças que utilizaram multimistura, destacando-se aquelas entre 49-60 meses e as maiores de 72 meses de idade. Este estudo apontou também aspectos importantes que devem ser levados em consideração ao realizar um programa de suplemento alimentar, tais como participação e acompanhamento de profissionais da saúde, utilização de líderes comunitários nos programas e desenvolvimento de ações de educação para a saúde.

Soares et. al. (2004) acompanharam a ocorrência de agravos à saúde nas mesmas crianças avaliadas por Velleda (2004) e constataram que, apesar de utilizarem a multimistura as crianças apresentaram percentual elevado de agravos, como diarreias, anemia, infecções respiratórias, gripe, afecções da pele e verminoses. Porém, ressaltaram que a maioria das crianças estudadas mora às margens da Lagoa dos Patos, próximo ao parque industrial e ao principal escoadouro de esgoto orgânico, onde se banham no verão.

2.2 Estudos desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica de Alimentos

Faria et. al. (2005) estudaram as propriedades físico-químicas, biológicas e disponibilização de nutrientes de diferentes composições de multimistura e verificaram que a fermentação com levedura de panificação melhorou a qualidade nutricional destas. Além disso, foi realizada uma avaliação biológica (com ratos) das mesmas, demonstrando que a folha de mandioca presente em algumas formulações prejudicou o desenvolvimento dos animais.

Feddern (2007) estudou a biodisponibilização de nutrientes em multimisturas (MM) que diferiram em composição e processo fermentativo. Foram elaboradas e caracterizadas oito MM diferentes quanto ao farelo (arroz ou trigo), presença/ausência de folha de mandioca, submetidos ou não a processo fermentativo em estado sólido com *Sacharomices Cerevisae* como inóculo (30°C por 6 h). As MM foram avaliadas biologicamente através do coeficiente de eficiência alimentar (CEA), razão de eficiência protéica (PER), razão de eficiência líquida protéica (NPR) e digestibilidade aparente (DA) e verdadeira (DV). Foram realizados testes bioquímicos como determinação de glicose sanguínea e cálcio plasmático nas ratas. A fermentação do farelo de arroz ocasionou uma diminuição nos valores de pH, metionina disponível e carboidratos, proporcionando um aumento da acidez, dos açúcares redutores, cinzas e fibras. Os teores de cálcio, proteína e lipídios não foram alterados. As MM com farelo de arroz apresentaram médias dos teores de lipídios, cinzas, fibras, acidez e digestibilidade *in vitro* mais elevadas do que as com farelo de trigo, que por sua vez apresentaram teores de proteínas, carboidratos e pH maiores que as com farelo de arroz. Em algumas MM a fermentação ocasionou aumento nos conteúdos de proteínas, minerais, fibras e acidez, porém uma diminuição dos carboidratos, metionina disponível e pH. Com relação aos efeitos biológicos, a fermentação ocasionou aumento no CEA na maioria das MM, não influenciando o PER, o NPR, a digestibilidade *in vivo* ou *in vitro*, a glicemia e o cálcio plasmático. A presença da folha de mandioca não influenciou na composição físico-química, mas tendeu a apresentar melhores CEA's que as demais MM. As MM contendo farelo de trigo apresentaram valores de digestibilidade *in vivo* superiores às multimisturas com farelo de arroz.

Santos et al. (2007) estudaram a conservação e efeito bioativo de MM enriquecidas com a microalga *Spirulina* através de indicadores químicos e de sua atividade antioxidante. Os autores realizaram dois experimentos de avaliação da conservação das formulações. No primeiro foram formuladas 4 MM, diferindo quanto ao farelo - arroz ou trigo - e quanto ao nível de *Spirulina* - 1 ou 2%. No segundo experimento, foram formuladas outras 4 MM, duas iguais ao do primeiro experimento

(com 1% de microalga) e outras duas com a substituição da *Spirulina* por semente de girassol. As formulações foram armazenadas em recipientes de vidro sob refrigeração e a temperatura ambiente. Os resultados do estudo demonstraram que as MM contendo farelo de arroz apresentaram maiores valores de acidez total e alcoólica, índice de peróxido, digestibilidade, conteúdo fenólico e atividade antioxidante quando comparadas às formulações com farelo de trigo. As MM refrigeradas indicaram um aumento no tempo de conservação; em média 11 dias para as formulações com farelo de arroz e 5 dias para as com farelo de trigo. A adição da microalga nos níveis do estudo não ocasionou efeito significativo nos indicativos de qualidade estudados.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar a biodisponibilidade de nutrientes de diferentes composições de multimistura na dieta de ratos *Wistar*.

3.2 Específicos:

- Medir a concentração de ferro das multimisturas e avaliar biologicamente sua biodisponibilidade em relação a uma dieta padrão;
- Avaliar o desenvolvimento corporal de ratas *Wistar* alimentadas com diferentes composições de multimisturas em comparação a um grupo controle;
- Analisar as respostas nutricionais dos farelos de trigo e de arroz e da adição da microalga *Spirulina platensis* na dieta dos animais;
- Estudar o efeito das multimisturas e da adição da microalga *Spirulina platensis* nos índices bioquímicos dos animais.

4. JUSTIFICATIVA

Apesar de o Brasil estar passando por um processo de transição nutricional, com a obesidade e o sobrepeso sendo mais comuns que a desnutrição, a anemia continua com um aumento crescente de sua prevalência entre menores de 5 anos (BATISTA FILHO & RISSIN, 2003).

O baixo consumo de ferro e sua baixa biodisponibilidade nos alimentos que compõem a dieta são a principal causa de anemia na infância. A biodisponibilidade de ferro depende principalmente da fonte do mineral na alimentação, mas também da combinação desta com outros componentes da dieta. O ferro derivado de produtos de origem vegetal (ferro não heme) tem, geralmente, biodisponibilidade baixa, ao contrário do encontrado nas carnes em geral (ferro heme) (SANTOS et. al., 2005).

Sendo a multimistura composta basicamente de farelos de cereais, ela apresenta uma baixa biodisponibilidade de ferro, apesar de seu conteúdo total ser expressivo, variando de 3,8 a 14,7 g/100g. Além disso, como a porção de multimistura recomendada para crianças menores de 5 anos é muito pequena (2 colheres de chá/dia), ela não atinge o mínimo necessário de 25% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) do micronutriente (VIZEU et. al., 2005).

Deve atentar-se também ao fato de que há vários componentes presentes na multimistura afetam a absorção de ferro pelo organismo, como a presença de ácido fítico, que forma sais insolúveis com o ferro no pH intestinal; as interações intraluminais por combinação química entre os componentes da fibra da dieta e o mineral, que faz com que aumente a excreção fecal, comprometendo a utilização deste nutriente. Além disso, um aumento na ingestão de cálcio pode resultar na instalação de um quadro de anemia em indivíduos que tenham uma ingestão marginal de ferro. Dentre os sais que interferem na biodisponibilidade de ferro sabe-se que o carbonato de cálcio, presente em grande quantidade na casca do ovo, é o responsável por maior redução da biodisponibilidade do ferro (COELHO, 1995).

A Sociedade Brasileira de Pediatria analisou e aprovou o informe técnico de pesquisadores da UNICAMP que ressalta que *“o valor nutritivo de qualquer alimento não pode ser estabelecido com base na quantidade (dosagem química) de seus nutrientes, uma vez que sua qualidade nutricional é determinada por uma série de fatores, como o equilíbrio em seus constituintes, as interações entre os diversos compostos da dieta, o estado fisiológico do indivíduo, as condições de processamento, armazenagem e a ocorrência de antinutrientes”*.

Assim, tem-se tentado encontrar alternativas tecnológicas para que a multimistura seja otimizada. Sua composição tem sido modificada com o intuito de remover ou anular o efeito dos fatores antinutricionais e aumentar a biodisponibilidade dos nutrientes, seja substituindo algum ingrediente da mistura ou submetendo estes a processos que venham a inibir seu efeito deletério.

Para que possa ser utilizada com segurança como alternativa alimentar no combate às carências nutricionais, mais estudos são necessários visando o melhoramento da multimistura para que, de fato, seja efetiva. Este trabalho propõe um teste *in vivo* de diferentes composições de multimisturas formuladas com co-produtos regionais e adicionadas de uma microalga rica em nutrientes, para avaliação das mesmas na biodisponibilidade nutricional.

– CAPÍTULO II –
REVISÃO DE LITERATURA

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Multimistura

Segundo BITTENCOURT (1998), entende-se por alimentação alternativa ou multimistura os nomes utilizados para designar a proposta de enriquecer a dieta habitual da população brasileira com a combinação de alimentos não convencionais, entre eles: farelo de arroz, farelo de trigo, casca de ovo, pó e sementes de vegetais e casca de frutas e verduras.

O uso da alimentação enriquecida com multimistura começou há 30 anos com o trabalho desenvolvido pelos médicos Clara e Rubens Brandão, no Pará. Mas foi a partir da avaliação positiva de um relatório realizado pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef), no qual se apontava a redução drástica das formas graves de desnutrição, que este tipo de alimentação começou a ser difundida pelo País (NOGARA *et al.*, 1994 apud BITTENCOURT, 1998).

A Pastoral da Criança é um organismo de ação social da CNBB - Conferência Nacional dos Bispos do Brasil – de atuação nacional que tem como objetivo o desenvolvimento integral das crianças, da concepção aos seis anos de idade, em seu contexto familiar e comunitário. Esta organização vem realizando ações concretas para o aproveitamento de produtos de grande valor nutricional e baixo custo, disponíveis nas próprias comunidades, além de evitar os desperdícios de grande parte dos alimentos, como as folhas, cascas e sementes (UNICEF, 1994).

Desde 1985, a Pastoral da Criança trabalha com um conceito amplo de alimentação. A alimentação Enriquecida preconiza o resgate das práticas tradicionais de alimentação, valoriza os produtos cultivados regionalmente, respeitando seus costumes alimentares, busca uma alimentação completa, mais natural e saudável, e orienta o consumo de alimentos não convencionais, ricos em nutrientes como, por exemplo, a adição de farinhas de cereais, farelo de trigo e de arroz, folhas verde-escuras, sementes e casca de ovo. Tal recomendação está baseada na aplicação do conceito de que nem sempre se aproveita o alimento integralmente, onde folhas, cascas e sementes, que geralmente são descartadas, teriam valor nutritivo (BITTENCOURT, 1998).

Milhares de crianças desnutridas são recuperadas todos os anos pela Pastoral seguindo esta orientação alimentar em conjunto com todas as ações básicas de saúde, educação nutrição e cidadania.

5.2 Formulações de multimistura

Apesar de alguns componentes terem se tornado básicos em qualquer formulação de multimistura, não existe fórmula pronta para a mesma. A multimistura deve ser feita de acordo com a necessidade de quem vai utilizá-la, com alimentos típicos de cada região e que sejam de fácil acesso.

A formulação da multimistura adotada pela Pastoral da Criança compreende 80% de farelo de trigo e/ou arroz, 10% de pó de casca de ovo, 5% de pó de sementes comestíveis e 5% de pó de folhas verdes (BRANDÃO, 1996).

Existem multimisturas disponíveis comercialmente, como é o caso da Multimistura New Life, que apresenta em sua composição folhas desidratadas de alfafa, abóbora e batata doce, farelos de arroz, aveia e trigo, sementes de abóbora, gergelim, girassol, linhaça e sal marinho. Esta multimistura pode ainda ser encontrada com adição de cogumelos *Agaricus*, uma vez que estes estão relacionados com o sistema imunológico e possuem mais que o dobro das vitaminas, aminoácidos e sais minerais que a média dos cogumelos comestíveis, ou ainda de linhaça, tendo em vista que a linhaça é rica em proteínas, fibras, vitaminas e minerais além de ser fonte de ácidos graxos ômega 3, mas estas multimisturas com adições devem ser consumidas apenas por adultos.

TABELA 1. Valores nutritivos por porção de 45g (3 colheres de sopa cheias)

Quantidade por porção	
Valor Calórico	130 kcal
Carboidratos	14 g
Proteínas	7 g
Gorduras Totais	5 g
Gorduras Saturadas	1 g
Colesterol	zero
Fibra Alimentar	13 g
Cálcio	58 mg
Ferro	6,12 mg
Sódio	450 mg

Fonte: Multimistura New Life

Na região Sul do Brasil, a multimistura apresenta na sua composição farelo de arroz, farelo de trigo, farinha de arroz, farinha de milho, farinha de mandioca, folha de mandioca desidratada e moída, casca de ovo moída, sementes trituradas, tais como

sementes de abóbora, de melancia, de melão ou de girassol (GOMES & FONSECA, 1999).

Na cidade do Rio Grande, no estado do Rio Grande do Sul, a Secretaria Municipal de Saúde juntamente com a Universidade Federal do Rio Grande produzem uma multimistura que apresenta em sua formulação farelo de trigo (que pode ser substituído por farelo de arroz), farinha de milho, casca de ovo moída, sementes de girassol e folha de mandioca desidratada e moída. Na região de Pelotas, situada no mesmo Estado, a multimistura apresenta formulação diferente, sendo composta por: farelo de arroz, farelo de trigo, casca de ovo moída, folha de mandioca desidratada e moída, semente de abóbora triturada, farinha de mandioca, farinha de milho e farinha de arroz (GOMES & FONSECA, 1999).

Tendo em vista que a formulação da multimistura é modificada de acordo com a região em que é produzida, seus valores nutricionais variam entre as diversas formulações que são encontradas (BRANDÃO, 1988).

5.3 Ingredientes da multimistura

A multimistura é constituída, basicamente, de farelos, farinhas, folhas verde-escuras, pós de sementes e cascas (BRANDÃO & BRANDÃO, 1996), mas seus componentes variam de acordo com os produtos disponíveis nas diferentes regiões do país.

De acordo com BRASIL (2000), a multimistura deve conter no mínimo 70% de farelos torrados (podendo ser de trigo, arroz, milho e/ou aveia) e pó de folha de mandioca, batata doce, abóbora e/ou chuchu. Como ingredientes opcionais, podem ser utilizados pó de sementes torradas de abóbora, girassol, melão e/ou gergelim; nozes, castanhas; farinha e amidos torrados de cereais, raízes e/ou tubérculos; leite em pó; germen de trigo e outros ingredientes que não descaracterizem o produto. A utilização de outros farelos e/ou de outras folhas de vegetais ou pó de outras sementes, cascas de vegetais, cascas de ovos de aves e novos ingredientes poderão ser autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde que sejam apresentados estudos conclusivos de avaliação de riscos e segurança de acordo com regulamento técnico específico.

5.3.1 Farelos

Através do processo de beneficiamento de cereais integrais, como arroz e trigo, são obtidos os farelos. Além de ser um concentrado de minerais (ferro, cálcio, zinco e

magnésio) e de vitaminas (B1, B2 e niacina), possui também grande capacidade de retenção de água, proteínas, hidratos de carbono, gorduras e fibras alimentares (HOSENEY, 1991).

Os farelos empregados na multimistura devem ser tostados para disponibilizar os nutrientes, evitando também que estes rancifiquem, e devem ser de boa procedência para evitar uma possível contaminação devido à falta de higiene (BITTENCOURT, 1998).

O farelo de arroz contém de 11 a 13% de proteína bruta e 10 a 15% de gordura, com aproximadamente 11,5% de fibras. A gordura é altamente insaturada e facilmente oxidável (HOSENEY, 1991). Este farelo possui ainda componentes antioxidantes, entre eles, o orizanol, que já demonstrou capacidade hipocolesterolêmica quando administrado em ratos (SEETHARAMAIAH & CHANDRASEKHARA, 1993, apud LEMOS & SOUZA-SOARES, 2000).

O farelo de trigo é retirado do grão no processo de refinamento industrial. É rico em fibras, vitaminas do complexo B e outros nutrientes vitais para a manutenção e recuperação da saúde. Apresenta em média 16% de proteína bruta, 4,5% de gorduras e geralmente em torno de 10% de fibra bruta. A sua proteína é de melhor qualidade que a do milho e a do grão total do trigo. É um alimento rico em fósforo comparativamente à classe a que pertence, porém é pobre em cálcio. É rico em niacina, mediantemente rico em tiamina e pobre em riboflavina (CÂMARA & MADRUGA, 2000).

O farelo do trigo, que se obtém em separado do germe, possui óleos menos rancificantes e teores 80% mais baixos de fitato do que o farelo de arroz (em torno de 6%), razão pela qual o primeiro é um resíduo mais nobre que seu congênere do arroz.

Assim, é evidente que não houve, ao longo dos tempos, negligência por parte dos governos, nem falta de esclarecimento dos nutricionistas, engenheiros de alimentos ou industriais, que resultasse no desprezo acidental do farelo do arroz. O paradoxo de o valor nutritivo do farelo de arroz ser diminuto, apesar do seu elevado conteúdo de nutrientes, induz algumas pessoas ao erro, assinalando-lhe valor biológico apenas pelo que as análises químicas revelam (FARFAN, 1998).

5.3.2 Farinhas

As farinhas resultam do processo de moagem de vários grãos, após seleção de matérias-primas adequadas, sendo ricas em amido, proteína e gordura.

A farinha de milho apresenta teores semelhantes tanto de fibra total quanto das frações solúvel e insolúvel, o que indica a presença de proporções semelhantes das diferentes estruturas do grão na farinha, porém com predominância da fração insolúvel (DUTRA *et al.*, 2002).

A farinha de arroz é produzida a partir de matérias-primas selecionadas eletronicamente, oriundas do beneficiamento diário de arroz, apresentando amido, os sete aminoácidos do arroz e todas as suas substâncias nutritivas (HOSENEY, 1991).

Obtida da moagem dos grãos de soja integrais tostados, a farinha de soja pode substituir as farinhas convencionais nos mais diversos produtos. Fornece óleo de ótima qualidade biológica, além de proteínas, sais minerais vitaminas e aminoácidos essenciais.

A farinha de mandioca é um dos principais produtos da mandioca e seu uso é muito difundido em todo o país. É um alimento rico em carboidratos, particularmente o amido, e fibras, mas possui baixos teores de lipídios, cálcio, fósforo, sódio e potássio quando comparadas com soja e o trigo (SANT'ANNA *et al.*, 2002).

5.3.3 Sementes

As sementes auxiliam no combate da ameba, giárdia e outras verminoses e são ricas em gordura, proteína, vitaminas e minerais, onde além da energia e da formação dos músculos, são importantes para regular o funcionamento do corpo. A semente de girassol contém fosfato, magnésio, proteínas, selênio e lecitina e contribui no fortalecimento dos pulmões, dos nervos e protege contra doenças cardíacas (FURTUNATO, 2003).

5.3.4 Folha de mandioca

As folhas verdes dos vegetais têm-se mostrado favoráveis para servirem como fonte de proteínas, constituindo, assim, uma alternativa alimentar no combate à desnutrição, tanto de maneira indireta, sob a forma de rações animais que servirão de alimento para o homem, quanto diretamente na dieta humana (MODESTI, 2006).

No Brasil, alguns pesquisadores têm estudado as folhas de mandioca, procurando uma possível alternativa para substituir alimentos convencionais, pois seu teor em proteínas, vitaminas e minerais é relativamente alto, quando comparado a hortaliças folhosas e grãos de cereais, além de apresentarem baixo custo e disponibilidade (MODESTI, 2006).

Apesar da folha de mandioca ser uma das maiores fontes de vitamina A e sais minerais, o que a torna um poderoso complemento nutricional, seu consumo é controverso devido a presença de taninos e do ácido cianídrico. Alguns pesquisadores afirmam que a folha de mandioca desidratada e moída apresenta fatores antinutricionais em níveis aceitáveis, podendo, portanto, ser utilizada na alimentação humana (AZEREDO *et al.*, 1998; CORREA *et al.*, 2002).

Para maior disponibilização de vitamina A, minerais como o ferro e proteínas, a folha de mandioca utilizada na multimistura deve ser moída (AZEREDO *et al.*, 1998).

5.3.5 Casca de ovo

O pó da casca de ovo é utilizado como fonte de cálcio, um nutriente importante para o crescimento infantil, na gravidez, na conservação de dentes e ossos e recuperação da saúde em geral (BRANDÃO & BRANDÃO, 1996).

O cálcio representa globalmente 37,3% (2,3g em uma casca de 6g) e o carbonato 58% da composição da casca de ovo. Quando ingerida grande quantidade de cálcio, ele acaba prejudicando a absorção do ferro e, por isso, uma pequena quantidade de pó de casca de ovo já é suficiente para enriquecer a alimentação diária (ANDRADE & CARDONHA, 1998). Ela entra como componente na formulação da multimistura na proporção de 10% (AZEREDO, 2003).

A casca de ovo pode conter um microrganismo, a Salmonella, que causa um tipo grave de diarreia, e por este motivo os ovos devem ser bem lavados antes de serem quebrados (ANDRADE & CARDONHA, 1998).

5.4 Spirulina platensis

A cianobactéria *Spirulina platensis*, alga filamentosa unicelular, é uma das mais utilizadas no mundo como alimento e para obtenção de aditivos utilizados em fórmulas farmacêuticas e alimentos. Ela cresce naturalmente em lagoas alcalinas, como a Lagoa Mangueira, que se localiza na região sul do estado do Rio Grande do Sul (WEBER *et al.*, 2000; CHAMORRO *et al.*, 2002).

Essa microalga era utilizada há séculos por diferentes populações e foi redescoberta recentemente e estudada por vários pesquisadores; chamando a atenção por suas propriedades nutricionais e antioxidantes (FALQUET, 1996; CEZARE, 1998).

A *Spirulina* apresenta uma composição química variável conforme a origem e condições de cultivo, mas as características principais estão sempre presentes (JASSBY, 1988). O conteúdo de proteína dessa microalga varia entre 50 e 74% de seu peso seco e é formado por proteínas completas do ponto de vista qualitativo, uma vez que contém todos os aminoácidos essenciais, que perfazem 47% do peso protéico total. Esse nível é muito elevado, mesmo entre microrganismos (CONTRERAS *et al.*, 1979; VONSHAK, 1997). Dentre os aminoácidos essenciais, os sulfurados (metionina e cistina) são os limitantes, porém mesmo assim estão presentes em mais de 80% do nível recomendado pela FAO (*Food and Agricultural Organization*) e aparecem em maior abundância nessa microalga que nas proteínas de cereais, grãos e folhas (HENRIKSON, 1984).

A *Spirulina* possui ácidos graxos poliinsaturados, sendo uma fonte potencial de ácido γ -linolênico (GLA), o qual constitui cerca de 20-25% dos lipídios da microalga (COLLA, 2002). Os carotenóides compreendem cerca de 3,3% dos lipídios totais, estando o β -caroteno entre os mais abundantes.

Além disso, essa microalga é fonte de vitaminas lipossolúveis como a pró-vitamina A, vitaminas E e K bem como as do complexo B e vitamina C. Segundo Jassby (1988), apenas 1,8 g de *Spirulina* alcançaria o valor de RDA (*Recommended Dietary Allowances*) para a vitamina B₁₂, importante fator para a formação das células vermelhas do sangue.

Dentre os minerais, destaca-se o ferro, sendo que somente 12 g de *Spirulina* seriam suficientes para suprir as necessidades do mineral no organismo (DILLON *et al.*, 1995 e KAY, 1991 apud LOH *et al.*, 2006; WEBER *et al.*, 2000; JASSBY, 1988). Em estudos realizados foi demonstrado que o ferro presente na *Spirulina* é de alta biodisponibilidade e bom regenerador de hemoglobina em ratos (KAPOOR e MEHTA, 1993; PUYFOULHOUX *et al.*, 2001).

As variações entre as amostras e condições de cultivo devem ser consideradas para que não haja sub ou superestimativas quanto ao conteúdo nutricional da microalga.

O alto conteúdo de ácidos nucléicos (DNA e RNA) em algas e microrganismos limitam seu uso como alimento, pois a degradação de parte de seus componentes (as purinas adenina e guanina) terminam na produção de ácido úrico os quais podem precipitar e formar cristais de urato de sódio, resultando em extrema sensibilidade das

articulações (gota) e depósito de pedras nos rins. A *Spirulina* apresenta cerca de 4% de ácidos nucléicos, o que limita seu uso a 50g por dia segundo recomendações da FAO. (WASLIEN, 1975; JASSBY, 1988).

5.5 Legislação

5.5.1 Legislação para Multimisturas

Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Mistura à base de Farelo de Cereais, aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que tem como objetivo fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que deve obedecer a mistura à base de farelo de cereais, têm-se, nos itens apresentados, que:

- Ingredientes obrigatórios: Farelos torrados de trigo ou de arroz ou de milho e/ou de aveia, em quantidade mínima de 70% e pó de folha de mandioca, batata doce, abóbora e/ou chuchu. A utilização de outros farelos e/ou de outras folhas de vegetais poderá ser autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, desde que sejam apresentados estudos conclusivos de avaliação de riscos e segurança de acordo com legislação específica.
- Ingredientes opcionais: pó de sementes torradas de abóbora, girassol, melão e/ou gergelim; nozes, castanhas; farinha e amidos torrados de cereais, raízes e/ou tubérculos; leite em pó; gérmen de trigo e outros ingredientes que não descaracterizem o produto. A utilização de pó de outras sementes, cascas de vegetais, cascas de ovos de aves e novos ingredientes poderão ser autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, desde que sejam apresentados estudos conclusivos de avaliação de riscos e segurança de acordo com regulamento técnico específico.
- Todos os ingredientes utilizados, incluindo os farelos, folhas e pó de sementes, devem ser específicos para o consumo humano.
- Acondicionamento: O produto deve ser acondicionado em embalagens adequadas às condições previstas de transporte e armazenamento e que confirmem ao produto a proteção necessária.
- Aditivos: Não é permitida a utilização de aditivos intencionais e coadjuvantes de tecnologia de fabricação.

- Contaminantes: Devem estar em consonância com os níveis toleráveis na matéria-prima empregada, estabelecidos em regulamento técnico específico.
- Higiene: Os produtos devem ser processados, manipulados, acondicionados, armazenados, conservados e transportados conforme as boas práticas de fabricação atendendo a legislação específica.
- Quanto às características sensoriais deve apresentar aspecto, cor, odor e sabor característicos e quanto às características físicas e químicas deve apresentar umidade e substâncias voláteis a 105 °C máxima de 6%, resíduo mineral fixo de no mínimo 5,5%, fibra bruta mínima de 8%, acidez de no máximo 5%, ácido cianídrico de no máximo 4 ppm e ácido fítico de no máximo 0,1%.
- Rotulagem: Deve obedecer ao Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados, e, obrigatoriamente, apresentar quantidade recomendada para cada estado fisiológico e faixa etária, as seguintes advertências: “Este produto não poderá ser consumido como única fonte de alimento” e “Este produto não deve ser utilizado na alimentação de crianças nos primeiros doze meses de vida”, modo de preparo/uso, armazenamento e conservação.
- A avaliação da identidade e qualidade deverá ser realizada de acordo com os planos de amostragem e métodos de análise adotados e/ou recomendados pela AOAC, ISO, pelo Instituto Adolfo Lutz, pelo Food Chemicals Codex, pela APHA, pelo BAM e pela comissão do Codex Alimentarius e seus comitês específicos, até que venham a serem aprovados planos de amostragem e métodos de análises pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

5.5.2 Legislação para Spirulina

De acordo com a legislação vigente aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Spirulina* são microalgas do grupo das cianosquizofiteas (Algas Azuis) marinhas ou dulcequíolas, cujas espécies comestíveis do gênero compreendem: *platensis* e *máxima*. Apresentam alto conteúdo de proteínas combinado com quantidades variáveis de vitaminas do complexo B, especialmente B12, pró-vitaminas K, E e PP/A, e minerais como o cálcio, fósforo, ferro, sódio, potássio e magnésio.

O produto deverá conter no mínimo 55% de proteínas e não exceder a ingestão diária de 50 gramas (2 g/dia de ácidos nucleicos).

- Categoria: Complemento Nutricional.

- Características Gerais: O produto deverá ser apresentado em forma pura, sem a presença de aditivos e acondicionado em cápsulas compostas de gelatina e de glicerina. Poderá ser utilizado ingrediente com finalidade de coadjuvante de tecnologia de fabricação, quando utilizada cápsula gelatinosa dura.
- Rotulagem: Deverá conter a composição; ingestão diária recomendada, finalidade de uso; prazo de validade, lote e data de fabricação e cuidados de conservação.

5.6 Estudos Realizados com Multimistura

5.6.1 Multimistura na dieta de crianças

Gigante *et al.* (2007) estudaram o efeito de uma multimistura adicionada à merenda de crianças maiores de 12 meses de escolas municipais de Pelotas – RS. O trabalho foi do tipo intervenção, onde um grupo de crianças recebeu merenda com adição de 10g de multimistura e outro grupo (controle) não sofreu qualquer alteração na dieta. A multimistura utilizada no estudo era constituída por 30% de farelo de arroz, 30% de farelo de trigo, 10% de farinha de trigo, 15% de farinha de milho, 5% de pó da folha da mandioca, 5% de pó da casca do ovo e 5% de pó de semente de abóbora ou de girassol. Para garantir a segurança higiênico-sanitária da multimistura, um sistema de boas práticas de fabricação e análise dos perigos e pontos críticos de controle (APPCC) foi implementado. Foram avaliados os índices de estatura/idade, peso/idade e peso/altura; além de valores de hemoglobina durante os 6 meses de duração do estudo. Ao final do estudo, não houve diferença em nenhum dos indicadores analisados; as prevalências de déficit de estatura para idade, sobrepeso e anemia foram semelhantes entre os grupos controle e intervenção. Entretanto, vale ressaltar que a prevalência de anemia foi de quase 50% em ambos os grupos.

Sant'ana *et al.* (2006) estudaram o efeito de uma multimistura no estado nutricional relativo ao ferro em pré-escolares de 25 a 68 meses de idade, da rede municipal de ensino de Viçosa- MG. Participaram de todas as etapas do estudo 36 crianças freqüentadoras de três creches, sendo que na creche A foram oferecidos produtos de panificação sem acréscimo de ferro, na creche B, produtos acrescidos de sulfato ferroso em quantidade equivalente ao teor de ferro fornecido pelas preparações com multimistura oferecidos na creche C. Os produtos foram distribuídos por 70 dias no período da manhã. A multimistura usada no estudo era composta por 33% de farinha de trigo, 33% de fubá de milho, 32% de farelo de trigo, 1% de pó de folha de mandioca e 1% de pó de casca de ovo. Eram oferecidas três refeições diárias nas creches, de segunda a sexta-feira. Para avaliação do consumo quantitativo de

alimentos ingeridos enquanto as crianças estavam na creche foi utilizado o método de pesagem direta, durante três dias consecutivos. Foram realizadas avaliações antropométricas (peso e estatura para idade), dietéticas (análise do consumo diário de nutrientes) e bioquímicas (eritrograma, ferritina e ferro séricos) no início e no final do estudo. As crianças da creche A (sem adição de ferro) apresentaram menor consumo de ferro proveniente dos produtos; já as das creches B (sulfato ferroso) e C (multimistura) tiveram semelhante ingestão de ferro, indicando que esses produtos divergiam apenas quanto à fonte de ferro administrada. Porém, não foi demonstrado efeito das diferentes fontes de ferro, dado que as creches suplementadas apresentaram redução dos níveis hematológicos avaliados, o que não ocorreu com a creche A. Observou-se que a média de ingestão de vitamina C aumentou na creche A; na creche B, as ingestões de vitamina A e C diminuíram ao longo do estudo e na creche C, observaram-se aumento no consumo de cálcio. Esses dados são de grande importância na análise dos resultados hematológicos, uma vez que a dieta fornece tanto inibidores quanto promotores da absorção de ferro, além de ser determinante no estado nutricional do indivíduo.

Oliveira *et al.* (2006) avaliaram o impacto da multimistura no estado nutricional de pré-escolares de quatro creches municipais de João Pessoa- PB. O estudo duplo-cego, onde nem os pesquisadores nem as crianças sabiam quem estava recebendo a multimistura, teve duração de dois meses. As 135 crianças foram divididas em 3 grupos: Controle (que recebeu farinha de mandioca como placebo); Intervenção 1 (que recebeu 5g da multimistura) e Intervenção 2 (que recebeu 10g da multimistura). A ingestão alimentar foi avaliada utilizando-se o método resto/ ingestão por três dias, antes e após a suplementação, visando avaliar a porção consumida. As crianças foram submetidas a avaliação antropométrica no início e ao final do estudo. Ao avaliar o impacto do consumo da multimistura no estado nutricional das crianças, não foram detectadas diferenças na alteração da média do peso e/ou altura entre os grupos, tanto no início quanto no momento final. Como foram consumidas pequenas quantidades do suplemento, não se justifica esperar alterações significativas sobre a recuperação de crianças em risco nutricional.

Siqueira *et al.* (2003) elaboraram uma multimistura na Universidade de Brasília a qual foi administrada em 31 escolares entre 3 e 11 anos de idade para investigar sua efetividade em melhorar a saúde das crianças. Todas as crianças foram acompanhadas através de medidas antropométricas e hematológicas antes e após o consumo de dieta suplementada com multimistura. Os resultados foram comparados

com um grupo controle composto por 26 crianças que consumiram dieta regular, sem o acréscimo da multimistura. Durante 7 meses, as 6 refeições das crianças foram suplementadas com 10g/criança/dia de multimistura. Ao final do estudo, foi observado um efeito benéfico no estado nutricional das crianças, pois a intervenção (durante 12 meses de acompanhamento) melhorou os parâmetros sanguíneos e reduziu a anemia, independente da suplementação com multimistura. A média altura/idade foi significativamente maior somente no grupo que recebeu a multimistura. As refeições suplementadas com 10g de multimistura/criança/dia aumentaram substancialmente a média diária de consumo de cálcio (45%), zinco (22%) e fósforo (22%), mas apesar da multimistura aumentar o conteúdo mineral, ela também proporcionou um aumento do ácido fítico. Os valores das proporções molares ácido fítico (PA):Fe aumentaram em todas refeições, mesmo assim, somente uma refeição ultrapassou o valor molar crítico de risco de redução na biodisponibilidade. A capacidade quelante da molécula de ácido fítico pode ter reduzido a biodisponibilidade de minerais da dieta e, o grau deste efeito negativo depende da proporção molar de fitato/elemento mineral. A quantidade de ácido cianídrico encontrado na multimistura, contendo 100g de pó de folha de mandioca foi $4,8 \pm 0,8$ mg/kg (base seca).

Segundo Wiener (2005), a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) avalia uma fórmula aperfeiçoada ao longo de 15 anos de experiência aplicada junto às crianças desnutridas expandindo-se à população adulta e a de terceira idade com resultados positivos, devidamente registrados e conferidos pelas pesquisas de laboratório. Os resultados registrados após utilização da Multimistura foram as seguintes: diarreia crônica inespecífica desaparece em 24 a 72 horas de utilização; observa-se a regulação do nível de glicemia com alguns dias de uso; mesmo nos casos resistentes a laxativos tradicionais (produtos farmacêuticos), casos de obstipação são resolvidos num prazo de 24 a 48 horas com uso contínuo; tem efeito terapêutico contra anemia ferropriva. Além disso, aumenta significativamente a produção do leite em nutrízes; acelera o desenvolvimento neuropsicomotor do desnutrido; diminui dores articulares e a necessidade de ingestão de grandes quantidades de açúcar, carne e volume de alimentos ingeridos.

5.6.2 Multimistura na dieta de ratos

Souza *et al.* (2006) estudaram a qualidade protéica de quatro multimisturas distribuídas para combater a desnutrição em comunidades do Município de Alfenas - MG. Foram utilizados ratos da raça Wistar, machos, distribuídos ao acaso em 6 grupos (n=6) em gaiolas individuais de aço inox, com temperatura controlada (25°C, desvio padrão= 2°C), durante 14 dias. O grupo padrão recebeu dieta à base de caseína, o

grupo controle, dieta livre de nitrogênio e os outros quatro grupos experimentais receberam dietas à base de multimistura. Para avaliação da qualidade protéica foram utilizados os métodos biológicos Quociente de Eficiência Protéica, Razão Protéica Líquida, Utilização Protéica Líquida e Digestibilidade Verdadeira. O quociente de eficiência protéica, a razão protéica líquida e a digestibilidade dos grupos recebendo multimistura foram inferiores ($p < 0,05$) ao da caseína. A utilização protéica líquida promovida pelas dietas à base de multimisturas foi inferior à dieta à base de caseína em todos os grupos experimentais, exceto no grupo cuja multimistura apresentava maior proporção de leite em pó e não era adicionada de pó de sementes, de folha de mandioca e de casca de ovo. A digestibilidade das multimisturas foi em torno de 89%, entretanto a utilização protéica foi de, aproximadamente, 27%.

Em trabalho realizado por Ferreira *et al.* (2005), foi avaliada a efetividade da multimistura na recuperação ponderal de ratos desnutridos. Após o desmame, 56 ratos Wistar foram distribuídos em 7 grupos conforme dieta recebida: controle; deficiente em vitaminas; deficiente em minerais; deficiente em vitaminas e minerais e dietas idênticas as deficientes, porém suplementadas com multimistura ao nível de 4%. A multimistura foi adquirida com a Pastoral da Criança de Maceió e era composta de 80% de farelo de trigo, 10% de pó de casca de ovo e 10% de pó de folha de mandioca. Os animais eram pesados semanalmente e tinham sua ingestão alimentar controlada. Após 28 dias de experimento, o valor biológico das dietas foi avaliado pelos indicadores: Coeficiente de Eficiência Protéica operacional (CEA), Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) e Ganho de Peso (GP). Todos os grupos apresentaram os indicadores avaliados inferiores ao do grupo controle, exceto o que recebeu dieta deficiente em vitaminas suplementado com multimistura. O grupo que recebeu dieta deficiente em minerais apresentou os piores resultados. A suplementação dessa dieta com a multimistura determinou a obtenção de valores significativamente superiores, mas aquém daqueles observados no grupo controle. Esses resultados sugerem que a suplementação de dietas pouco nutritivas com a multimistura, fornece as necessidades de vitaminas de ratos desnutridos e supre apenas parte das necessidades de minerais desses animais.

A UNICAMP utiliza o farelo de arroz na recuperação de carências nutricionais em ensaios feitos com animais experimentais, simulando as condições de processamento recomendadas pela Pastoral da Criança quanto à mistura, formulação e torrefação. Verificou-se que a capacidade de recuperação era praticamente nula (TORIN, 1991 apud WIENER, 2005). A proporção de farelo de arroz utilizada na

pesquisa da UNICAMP foi de 30 a 70%, quando a proporção de farelo utilizado na Pastoral da Criança é de 5% para crianças e 10% para adultos, não ultrapassando, portanto, o índice de 0,7%, o que é não prejudicial.

Santos *et al.* (2004) avaliaram a biodisponibilidade de minerais em 60 ratos machos da linhagem *Wistar*, sendo que todos foram mantidos com dieta aprotéica durante 14 dias. Após este período, cada grupo de 12 animais foi alimentado com dietas aprotéica – 0; controle – I; creche – II (baseada na alimentação de crianças de 2 a 6 anos em uma creche no município de João Pessoa- PB); creche + 1,2g de multimistura – III e creche + 2,4g de multimistura – IV. Os teores de potássio e magnésio foram mais elevados na dieta com 1,2g de multimistura, sendo que o teor de potássio não diferiu da dieta com 2,4g de multimistura. O teor de cálcio foi maior no grupo controle. A multimistura melhorou os níveis de cálcio, mesmo não havendo diferença estatística entre os mesmos. A multimistura contribuiu para elevar os níveis de magnésio nos animais e o teor de cálcio na dieta não interferiu na absorção do mesmo. Os autores constataram ainda, pela análise da ferritina, que a diminuição da mesma apresentada pelos ratos que receberam a ração suplementada com multimistura poderá resultar em problemas relacionados à absorção e controle do metabolismo do ferro, quando observados em experimentos a longo prazo.

Madruga *et al.* (2004) avaliaram nutricionalmente, pelo Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), dietas de creche adicionadas de 1,2g e 2,4g de multimistura, nos mesmos moldes do trabalho de Santos *et al.* (2004). Observaram que a multimistura não influenciou na recuperação ponderal de animais de laboratório.

Glória *et al.* (2004) realizaram avaliação biológica de uma multimistura contendo milho QPM BR473. Foram avaliados 36 ratos *Wistar* machos, com 21 a 23 dias de idade, que foram divididos em 6 grupos de 6 animais (cada) e alimentados com dietas de caseína contendo multimistura pura, com QPM BR473; láctea (contendo leite integral em pó); láctea contendo QPM BR473 ou a multimistura proposta (contendo QPM BR473, farinhas de aveia, soja e banana e açúcar mascavo). Foi medida a Retenção Líquida de Proteína (NPR) e Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA). Já que o milho QPM BR 473, variedade desenvolvida pela Embrapa/CNPMS de Sete Lagoas, é um alimento de alta qualidade protéica pelo seu perfil aminoacídico (rico em lisina e triptofano, cujas concentrações são maiores do que no milho comum), possui valor protéico correspondente a 83,5% das proteínas do leite, apresentou maior NPR (2,61) que as multimisturas. No entanto, seu valor não diferiu dos valores da multimistura láctea (2,46), da multimistura com QPM (2,44) e da caseína (2,76).

Porém, as multimisturas tradicional e tradicional + QPM apresentaram valores de NPR significativamente inferiores quando comparadas com a dieta padrão. Foi menor a eficiência alimentar para as multimisturas tradicionais com e sem QPM, quando comparadas com a multimistura proposta ou com as misturas lácteas com e sem QPM. Os resultados obtidos mostraram que o QPM BR473 pode ser usado em suplementos nutricionais, com alto valor nutritivo, expresso por sua qualidade protéica, e com baixa relação custo/benefício.

Guzmán-silva *et al.* (2004) analisaram a eficiência da suplementação alimentar da dieta de Quissamã- RJ, em recuperar a desnutrição em ratos mediante rações adicionadas ou não de suplemento, vitaminas e minerais durante o período de crescimento. Foram utilizados 42 *Rattus norvegicus* induzidos à desnutrição por 21 dias (ração hipoprotéica 2%, *ad libitum*). Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais, com 6 ratos cada, recebendo as rações durante 28 dias, todas isoprotéicas (10%) e isoenergéticas (350Kcal/100g). Foram elaboradas 7 dietas: controle + vitaminas; controle + suplemento alimentar (SA); controle + SA + vitaminas; Quissamã; Quissamã + vitaminas; Quissamã + SA e Quissamã + SA + vitaminas. A dieta de Quissamã foi elaborada com base no inquérito recordatório realizado pela equipe de profissionais da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Quissamã, com os pais de 27 crianças inscritas e participantes do projeto do Perfil Alimentar das crianças do Subprograma da Multimistura, conforme descrito por Boaventura *et al.* (2000). A curva ponderal do grupo CSA alcançou valores bem inferiores aos demais, apresentando valores que não se alteraram ao longo dos 28 dias e o peso desses animais foi significativamente inferior ao de todos os outros grupos. Os autores concluíram que a recuperação da desnutrição foi satisfatória para todos os grupos experimentais, salvo para o CSA, pois a adição do SA à dieta que tinha como fonte protéica a caseína, proteína de alto valor biológico, sem a adição de vitaminas e minerais (AIN-93) não teve nenhum efeito benéfico. Contudo, quando a adição do SA foi efetuada nos grupos que tinham como base protéica à dieta de Quissamã, os resultados foram favoráveis. A dieta de Quissamã, por si só alcança as necessidades mínimas para promover a recuperação da desnutrição, em termos do peso corporal e dos órgãos selecionados, sendo desnecessária a adição de vitaminas e minerais e/ou SA. Conclui-se então, que a problemática do município de Quissamã- RJ é o acesso aos alimentos em termos quantitativos e não qualitativos.

Boaventura *et al.* (2003) avaliaram o suplemento alimentar alternativo adicionado à Dieta de Quissamã, consumida por crianças desnutridas inscritas no

Subprograma da Multimistura da Secretaria de Saúde do município de Quissamã- RJ. O ensaio biológico foi desenvolvido durante 28 dias com 42 *Rattus norvegicus*, *Wistar*, machos (26 dias), do Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal Fluminense, divididos em sete grupos: 1- Grupo Controle (dieta à base de caseína) adicionado de vitaminas e minerais; 2- GCvm adicionado do Suplemento Alimentar; 3- Grupo Controle adicionado do Suplemento Alimentar; 4- Grupo Quissamã, à base da Dieta de Quissamã; 5- Grupo Quissamã adicionado de vitaminas e minerais; 6- GQvm adicionado do Suplemento Alimentar e 7- Grupo Quissamã adicionado do Suplemento Alimentar. O Grupo Quissamã apresentou o maior valor de hemoglobina e o Grupo Controle adicionado do Suplemento Alimentar obteve o maior valor de hematócrito, dentre todos os grupos que receberam ração de Quissamã. A suplementação da Dieta de Quissamã não se mostrou necessária neste experimento.

Azeredo *et al.* (2003) estudaram a influência da multimistura (MM) sobre o ganho de peso materno e fetal e sobre a hipertrigliceridemia materna no final do período gestacional. Foram utilizadas 120 ratas *Wistar*, divididas em quatro grupos: A- à base da dieta habitual do Estado do Rio de Janeiro (HERJ); B- à base da dieta habitual do Rio de Janeiro adicionada de 2% de MM (HERJ+MM); C- à base de caseína (CAS1) com 12% de proteína; D- controle caseína (CAS2) com 20% de proteína. A complementação da dieta HERJ com 2% de multimistura não aumentou o ganho de peso materno e fetal e não alterou a hipertrigliceridemia fisiológica. Concluiu-se que a utilização da multimistura, na proporção de 2% durante a gestação, não apresentou ganho de peso materno e fetal e não alterou a hipertrigliceridemia fisiológica.

Leite *et al.* (2002), em estudo semelhante, verificaram que o grupo HERJ+MM apresentou a menor produção de leite e o menor conteúdo de lactose, quando comparado com os outros, concluindo que o desempenho lactacional das ratas cuja ração foi suplementada com 2% de multimistura apresentou-se diminuída.

Em estudo realizado por Boaventura *et al.* (2000), semelhante ao anteriormente citado, foi avaliada a qualidade protéica de uma dieta estabelecida em Quissamã- RJ, adicionada ou não de multimistura e de pó de folha de mandioca. O ensaio biológico foi desenvolvido em duas fases, durante 28 dias, com 48 ratos. Na primeira fase denominada de Desnutrição, os animais foram distribuídos em Grupo Controle (GC) alimentados com ração à base de caseína, Grupo Quissamã (GQ) alimentados com ração à base da dieta estabelecida em Quissamã, ambos com 8 animais, e Grupo Aprotéico (GA) com 32 animais recebendo uma dieta isenta de proteínas durante 10

dias. Na segunda fase, denominada de Recuperação, com duração de 18 dias, os GC e GQ permaneceram recebendo a mesma ração. O Grupo Aprotéico foi desmembrado em grupos de 8 animais cada, denominados Grupo Desnutrido Controle (GDC) alimentado com a mesma ração do GC, e mais 2 Grupos Desnutridos, recebendo a mesma ração do GDQ, adicionada do pó de folha de mandioca (GDQ+FM) e da multimistura (GDQ+MM). A ração Quissamã foi avaliada biologicamente através do NPR, PER e PERm. Os autores verificaram que não houve diferença de peso entre os grupos desnutridos. Os dados de PER e NPR apresentaram diferença significativa entre o GC e o GQ, sendo que o GQ correspondeu a apenas 71,54% do NPR do GC. Nos dados do PERm, o GDC apresentou diferença significativa para os demais grupos (que não diferiram entre si). Baseado nos resultados dos indicadores biológicos NPR e PER utilizados neste experimento, foi concluído que, a ração consumida foi suficiente para promover o crescimento e a sua manutenção de forma satisfatória, sendo capaz de permitir a recuperação dos animais. Entretanto, a adição da multimistura e do pó de folha de mandioca, com base no indicador biológico PERm, não causou impacto sobre a qualidade da ração Quissamã, não tendo melhorado sua capacidade de recuperar a desnutrição.

5.7 Ferro: Importância e funções

Constituinte normal do corpo humano, o ferro se distribui amplamente tanto na forma orgânica quanto inorgânica, totalizando cerca de 3,5 a 4,5g em um indivíduo adulto. Por desempenhar funções fisiológicas, 70% desse total são considerados ferro funcional, e ocorrem na hemoglobina, mioglobina e enzimas intracelulares. Os 30% restantes constituem o ferro de armazenamento, ocorrendo na forma de ferritina ou hemosiderina. (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988 apud MARTINI, 2002).

As funções do ferro resultam de suas propriedades físicas e químicas, principalmente da sua habilidade de participar das reações de oxidação e redução, como é o caso das enzimas envolvidas no processo de respiração celular (MAHAN & ESCOTT-STAMP, 1998). Na hemoglobina suas funções principais são: atuar como vetor de oxigênio, formando com ele uma combinação facilmente dissociável, permitindo que o oxigênio transportado seja facilmente cedido aos tecidos na medida de suas necessidades; servir de catalisador da oxidação, nas células e nas moléculas livres de hemina e como constituinte das diástases oxidantes (catalases, peroxidases, citocromos), intervindo em numerosas reações de oxidação, por meio das quais se libera energia dos constituintes alimentares (GUYTON E HALL, 1997). A atividade de

muitas enzimas envolvidas nestas reações bioquímicas diminui durante a deficiência de ferro nos tecidos (BEARD *et al.*, 1996).

Os componentes da dieta e o estado nutricional do indivíduo têm significativa influência sobre a absorção de ferro da dieta (MARTINEZ *et al.*, 1999). Em condições normais, um ótimo padrão alimentar contém de 10 a 20mg de ferro, dos quais o indivíduo absorve cerca de 5 a 10%. Essa absorção compensa perdas de ferro através da descamação de células da pele, vias digestiva, urinária e respiratória (SILVA, 1994 apud MARTINI, 2002).

A tabela 2 apresenta as recomendações diárias de ferro expressas em mg/dia, de acordo com a Ingestão Diária Recomendada (DRI's).

TABELA 2. Recomendações diárias de ferro (mg/dia) por faixa etária.

Faixa etária	Ferro (mg/dia)
Homens	
9-13 anos	8
14-18 anos	11
≥ 19 anos	8
Mulheres	
9-13 anos	8
14-18 anos	15
19-50 anos	18
≥ 51 anos	8
Crianças	
0-6 meses	0.27
7-12 meses	11
1-3 anos	7
4-8 anos	10
Grávidas	
Todas faixas	27
Lactantes	
14-18 anos	10
≥19 anos	9

Fonte: *Dietary Reference Intakes* (2001).

5.8 Formas químicas e absorção do ferro

O ferro dietético é classificado em 2 formas químicas, de acordo com seu mecanismo de absorção: ferro heme, que é predominantemente encontrada nas carnes e vísceras, e ferro não-heme, que é encontrada em alimentos de origem vegetal (BIANCHI *et al.*, 1992; CARPENTER & MAHONEY, 1992).

De acordo com a forma, o ferro é absorvido por caminhos independentes na mucosa intestinal. O ferro heme é solúvel nas condições do intestino delgado, sendo facilmente absorvido pela mucosa intestinal sob a forma ferro porfirina intacta; dentro da célula da mucosa, o ferro é liberado pela ação da enzima heme-oxigenase, seguindo, a partir daí, os mesmos caminhos do ferro não-heme. Por causa desse mecanismo absorptivo único e sua solubilidade elevada no pH intestinal, o ferro heme não é afetado por fatores químicos ou alimentares que podem alterar a disponibilidade do ferro não-heme. Por essa razão, a absorção do ferro heme é alta, cerca de 15% no indivíduo normal e 35% naqueles com baixa reserva de ferro (COOK, 1983). Já a absorção do ferro não-heme é muito menor que a do heme: cerca de 0 a 10%, dependendo muito de fatores químicos, como o estado de oxidação, a solubilidade, o pH do meio, e, ainda, dos componentes dietéticos (BIANCHI *et al.*, 1992; ELPO *et al.*, 1998).

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

No meio ácido, os íons ferrosos e férricos não ocorrem em estado livre e são hidratados, respectivamente para $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ e $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. Com o aumento do pH, as moléculas de água doam prótons para formar hidróxidos insolúveis de ferro: $\text{Fe}(\text{OH})_2$ e $\text{Fe}(\text{OH})_3$. No pH=1, do estômago, o ferro é solúvel e está na forma hidratada. Quando o pH aumenta, o ferro torna-se um hidróxido insolúvel e, como a solubilidade é pré-requisito para a sua captação pelo intestino, a insolubilidade do ferro é o fator que, neste caso, dificulta sua absorção. Íons férricos no meio alcalino intestinal precipitam-se irreversivelmente e as macromoléculas resultantes de hidróxido férrico são muito grandes para serem absorvidas (BIANCHI *et al.*, 1992; GUYTON & HALL, 1997).

Há ampla variação na quantidade de ferro que pode ser absorvida. A absorção é afetada por fatores fisiológicos e por fatores que afetam a disponibilidade de ferro em sua fonte. As formas inorgânicas de ferro (FeSO_4) são prontamente absorvidas pela mucosa do intestino delgado, sendo a maior absorção no duodeno superior devido ao ambiente ácido (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

5.8.1 Fatores dietéticos inibidores da absorção

Os fatores que inibem a disponibilidade dos elementos traços podem formar compostos com estes elementos que são insolúveis, ou formar compostos mineral-agente inibidor que diminuem sua absorção por não transferir o elemento mineral para os receptores da mucosa intestinal (CLYDESDALE *et al.*, 1991).

Os componentes dietéticos que atuam como inibidores da absorção do ferro não-heme são os fitatos, compostos polifenólicos presentes em chá, café e vinho tinto, cálcio, avidina (em ovos), ácido oxálico, proteína da soja, fosfatos e elementos inorgânicos, como cobre e manganês (HEATH & FAIRWEATHER-TAIT, 2002). Porém, os relatos sobre o efeito exato e o mecanismo de ação destes fatores são ainda muito controvertidos (GERMANO, 2002).

5.8.2 Fatores dietéticos promotores da absorção do ferro

Os fatores dietéticos que aumentam a disponibilidade dos elementos traços de uma maneira geral são espécies de moléculas que formam compostos solúveis com os minerais; o complexo mineral-agente estimulador pode ser absorvido intacto, pode abrir caminho para lançar o elemento mineral na forma solúvel ou pode transferir o mineral para o receptor da mucosa (CLYDESDALE *et al.*, 1991).

Apesar da absorção do ferro não ocorrer no estômago, este contribui com o ácido clorídrico, que não só ajuda a remover o ferro, por desnaturação, caso esteja ligado a uma proteína, como também a solubilizá-lo, promovendo sua redução do estado férrico (pouco solúvel) para o estado ferroso (mais solúvel) (BEARD *et al.*, 1996).

Os fatores dietéticos estimuladores da disponibilidade do ferro não-heme mais claramente documentados são o ácido ascórbico, as carnes em geral, ácidos orgânicos como o cítrico e láctico, produtos fermentados de soja e peptídeos de cisteína (HEATH & FAIRWEATHER-TAIT, 2002).

Os mecanismos pelos quais se dá essa melhor absorção são baseados basicamente na solubilidade do ferro. O ácido ascórbico, como agente redutor, mantém o ferro dos alimentos no estado ferroso, que é mais solúvel. Também forma quelato ferro-ascorbato, que se mantém solúvel mesmo com o aumento de pH no intestino delgado proximal (GARCÍA-CASAL & LAYRISSE, 1998 apud GERMANO, 2002).

As carnes aumentam de duas a quatro vezes a absorção do ferro não-heme. O mecanismo exato pelo qual os organismos animais facilitam a absorção de ferro é ainda desconhecido, mas tem sido proposto que aminoácidos livres na luz intestinal, como a histidina, lisina e cisteína aumentam a absorção da espécie férrica, por formarem quelatos solúveis com o ferro (BIANCHI *et al.*, 1992).

5.9 Biodisponibilidade de ferro

O termo biodisponibilidade pode ser caracterizado como a proporção de um determinado nutriente em um alimento ou dieta que pode ser efetivamente utilizado pelo organismo. Neste contexto, a biodisponibilidade inclui a absorção e o transporte dos nutrientes para seus respectivos tecidos, assim como sua conversão em formas biologicamente ativas. (BENITO & MILLER, 1998).

No caso dos minerais, a biodisponibilidade é determinada, principalmente, pela eficiência de absorção a partir do lúmen intestinal para o sangue. Em alguns casos, entretanto, os nutrientes absorvidos podem estar numa forma em que não são utilizados. Por exemplo, os quelatos de ferro são absorvidos, mas o ferro não está disponível para incorporar-se às proteínas (CARRAZZA, 1998).

A quantidade total do ferro de um alimento ou dieta não indica a quantidade que será biodisponível, pois existem vários fatores que influenciam a absorção e utilização desse mineral. Desta forma, para garantir aporte adequado de ferro é necessário conhecer e diferenciar a quantidade total de ferro da quantidade biodisponível (YOUNG & JANGHORBANI, 1981). No caso do ferro, a biodisponibilidade refere-se à medida da fração do ferro alimentar capaz de ser absorvida pelo trato gastrointestinal e, subseqüentemente, armazenada e incorporada ao heme (BIANCHI *et al.*, 1992).

Segundo WIENK *et al.* (1999), a biodisponibilidade do ferro é resultante de um conjunto de etapas, que podem ser agrupadas da seguinte forma: primeiro, a digestibilidade, e mais especificamente a solubilidade de ferro no processo digestivo, que constituem um fator determinante para sua subseqüente biodisponibilidade; o segundo fator determinante é a absorção do ferro, propriamente dita, e sua passagem para a circulação sanguínea; e o terceiro caráter determinante é o processo de incorporação a um sistema funcional.

Sabe-se que a disponibilidade de ferro muda de acordo com certos estados fisiológicos. Lactentes, crianças, adolescentes e mulheres, especialmente gestantes,

possuem maiores necessidades, com conseqüente aumento da absorção (COTRAN e al., 1996 apud MARTINI, 2002).

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

5.10 Deficiência de ferro

A deficiência nutricional de ferro ocorre quando a quantidade absorvida da dieta é insuficiente para alcançar os requerimentos normais. As necessidades abrangem as perdas obrigatórias do organismo e os requerimentos nutricionais para o crescimento. (CARPENTER & MAHONEY, 1992).

Segundo OSÓRIO (2002), a anemia ferropriva caracteriza-se pela diminuição ou ausência das reservas de ferro, baixa concentração férrica no soro, fraca saturação de transferrina, concentração escassa de hemoglobina e redução do hematócrito. Primeiro diminuem as formas de reserva de ferro, ferritina e hemossiderina, persistindo normais os níveis de hematócrito e hemoglobina. Após, o nível sérico de ferro diminui e, simultaneamente, a capacidade de ligação do ferro na transferrina aumenta, resultando num decréscimo da porcentagem de saturação do ferro na transferrina. Como conseqüência, ocorre uma pequena diminuição da circulação das células vermelhas. Essa fase pode ser denominada deficiência de ferro sem anemia.

A anemia por deficiência de ferro representa o estágio mais avançado da hipossiderose, caracterizando-se pela diminuição da hemoglobina e do hematócrito, que se reflete em mudanças na citomorfologia eritrocitária, apresentando microcitose e hipocromia e causando distúrbio no mecanismo de transporte de oxigênio (OSÓRIO, 2002), além de prejuízos no mecanismo oxidativo, no metabolismo nuclear e na transcrição gênica (BEARD *et al.* 1996).

A anemia ferropriva acarreta atraso no desenvolvimento psicomotor e cognitivo de crianças menores de dois anos. As seqüelas clínicas do status pobre de ferro incluem ainda diminuição da eficiência da função imune, facultando a ocorrência e/ou, agravamento de doenças infecciosas, redução da atividade física, do rendimento do

aprendizado e da diminuição da performance no trabalho. (Horton & Ross, 2003 apud Machado, 2005; GRANTHAM-MCGREGOR & ANI, 2001; BEARD *et al.*, 1996; CARPENTER & MAHONEY, 1992).

Sintomas gastrointestinais como falta de apetite, flatulência, incômodo epigástrico, náuseas, vômitos, constipação ou diarreia são comuns. Quando a deficiência de ferro se torna mais severa, surgem defeitos estruturais e funcionais nos tecidos epiteliais, especialmente nas unhas, língua, boca e estômago. (OSÓRIO, 2002; ANDREWS *et al.*, 1999; CARPENTER & MAHONEY, 1992).

5.11 Proteínas

As proteínas são nutrientes essenciais aos organismos animal e humano e como tal, devem estar presentes na alimentação em quantidades adequadas. Deve-se levar em conta tanto o aspecto quantitativo das proteínas como o aspecto qualitativo. O valor nutritivo de uma proteína depende de sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais e ausência de propriedades antinutricionais (SGARBIERI, 1996).

Este nutriente está envolvido na maioria dos processos orgânicos e tem inúmeras funções metabólicas. Fornecem aminoácidos necessários para construção e manutenção dos tecidos; desempenham papel estrutural não só nos tecidos do corpo como também na formação de enzimas e hormônios. Estão envolvidas na função do sistema imunológico, como anticorpos. Na forma de lipoproteínas, participam no transporte de triacilgliceróis, colesterol, fosfolípídeos e vitaminas lipossolúveis.

Muitas vitaminas e minerais, inclusive o ferro, são ligados a carreadores protéicos específicos para seu transporte. As proteínas também contribuem para a homeostase através da manutenção de relações osmóticas normais entre os líquidos corpóreos (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998).

Por esses motivos torna-se importante que a qualidade das proteínas seja avaliada de forma a conhecer sua biodisponibilidade para o organismo.

5.12 Avaliação da qualidade das proteínas

Os métodos para avaliação das propriedades nutritivas das proteínas podem ser classificados em três categorias: químicos ou bioquímicos; biológicos e microbiológicos.

Quando se utiliza métodos biológicos, deve-se considerar os processos metabólicos, seja a via endógena, onde relaciona-se o aproveitamento tecidual ou a

exógena, a qual pode sofrer variações pois depende da quantidade de proteína ingerida (HERNÁNDEZ *et al.*, 1996).

5.12.1 Métodos Biológicos

Os métodos de ensaios biológicos para determinar a biodisponibilidade das proteínas alimentares são realizados normalmente em ratos e se baseiam em medir o ganho de peso ou o nitrogênio retido em função da proteína ingerida.

Como ocorre com a determinação da digestibilidade, alguns métodos consideram unicamente o metabolismo exógeno das proteínas, enquanto que outros consideram tanto o exógeno como o endógeno (VIROBEN e BERTRAND, 1985 apud HERNÁNDEZ *et al.*, 1996; PELLETT, 1978; SAMONDS e HEGSTED, 1977;).

Os métodos mais utilizados são: o Balanço de Nitrogênio (BN), Digestibilidade *in vivo* aparente e verdadeira, Valor Biológico, Utilização Líquida de Proteína (NPU), Quociente de Eficiência Protéica (PER), Quociente de Eficiência Líquida Protéica (NPR), Coeficiente de Eficácia Alimentar (FER).

5.12.1.1 Balanço de Nitrogênio (BN)

Os animais são colocados em gaiolas metálicas individuais, providas de dispositivos que permitam a coleta de fezes e urina, isentas de contaminação por partículas de alimento. A duração do teste é variável, normalmente de 5 a 10 dias dividido em duas fases, uma inicial considerada de adaptação à dieta ou alimento em que não se coleta material para análises, e a fase final onde se determina a quantidade de nitrogênio ingerido, através do consumo de alimento ao mesmo tempo em que se coletam fezes e urina para determinação do nitrogênio excretado. O número de animais também é variável, mas não deve ser inferior a 5 animais por tratamentos (SGARBIERI, 1996).

O balanço de nitrogênio é a diferença entre o nitrogênio ingerido e a soma do nitrogênio excretado nas fezes e na urina, conforme a equação 1.

$$BN = NI - (NF + NU) \quad (1)$$

5.12.1.2 Digestibilidade *in vivo*

A digestibilidade é a medida da porcentagem de proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado.

Os métodos utilizados para digestibilidade de proteínas baseiam-se em administrar aos animais do experimento uma dieta que contém a amostra como única

fonte de proteína. Determina-se a quantidade digerida mediante a diferença entre o ingerido e o eliminado pelos animais, esta é a dita digestibilidade aparente, que é dada pela equação 2.

A digestibilidade verdadeira, dada pela equação 3, é determinada levando-se em conta o nitrogênio proveniente do próprio animal e que é excretado nas fezes juntamente com as proteínas de origem alimentar não digerida. O nitrogênio do próprio animal é determinado nas fezes de um grupo igual de animais mantidos em dieta aprótica pelo mesmo período que durar o experimento (SGARBIERI, 1996).

$$Da = \left(\frac{N_{ingerido} - N_{excretado}}{N_{ingerido}} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$Dv = \left[\frac{N_{ingerido} - (N_{excretado_{teste}} - N_{excretado_{aprotéico}})}{N_{ingerido}} \right] \times 100 \quad (3)$$

5.12.1.3 Utilização Líquida de Proteína (NPU)

Há duas maneiras de se determinar o NPU, através do método direto e pelo método indireto.

No método direto, desenvolvido por Miller e Bender (1955), o conteúdo de nitrogênio das carcaças pode ser calculado a partir do conteúdo de água e o NPU, pelo quociente do nitrogênio retido pelo ingerido, subtraindo-se o valor de nitrogênio da dieta aprótica, conforme as equações 4, 5 e 6.

$$Y = 2,92 + 0,02X \quad (4)$$

onde X= idade dos ratos (dias)

$$Y = \left(\frac{Nitrogênio_{corporal}}{Água_{corporal}} \right) \times 100 \quad (5)$$

$$NPU = \left[\frac{N_{corporal_{teste}} - (N_{corporal_{aprotéico}} - N_{ingerido_{aprotéico}})}{N_{ingerido_{teste}}} \right] \times 100 \quad (6)$$

No método indireto, o NPU é calculado como o produto da digestibilidade verdadeira pelo valor biológico.

5.12.1.4 Valor Biológico

Segundo Sgarbieri (1996), o valor biológico (VB) do alimento pode ser obtido da relação expressa na equação 7.

$$VB = \frac{NPU}{Dv} \quad (7)$$

O valor biológico é dado pela relação entre o nitrogênio retido pelo nitrogênio absorvido, sendo que o nitrogênio retido é a diferença entre o nitrogênio absorvido (NA) e o nitrogênio eliminado na urina (NU) e, o nitrogênio absorvido é a diferença entre o nitrogênio ingerido na dieta (NI) e o nitrogênio eliminado nas fezes (NF) (SGARBIERI, 1996).

Pode-se calcular o valor biológico aparente e o valor biológico verdadeiro. O valor biológico verdadeiro é calculado levando-se em consideração o nitrogênio de origem endógena, tanto nas fezes como na urina. Os valores biológicos aparente e verdadeiro estão representados nas equações 8 e 9, respectivamente.

$$VBa = \left[\frac{NI - (NF + NU)}{NI - NF} \right] \times 100 \quad (8)$$

$$VBv = \left[\frac{NI - (NFa + NUa)}{NI - NFa} \right] \times 100 \quad (9)$$

5.12.1.5 Quociente de Eficiência Protéica (PER)

Segundo Hernández *et al.* (1996), o método do PER foi desenvolvido em 1919 por Osborne *et al.*, sendo o mais antigo e conhecido dentre os métodos de avaliação nutricional de proteínas. Em 1975, foi adaptado pela AOAC como método oficial para determinar a qualidade de proteínas.

Segundo os autores, são utilizados ratos machos da mesma cepa, de 21 a 28 dias, com peso inferior a 100g em gaiolas individuais. É sugerido um período de adaptação de 3 a 7 dias e 28 dias de ensaio. São administrados água e alimento *ad libitum* e como proteína de referência, a caseína ANRC. O fator mais significativo da dieta é o nível de proteína, 10% da matéria seca. Referente à sua composição, a AOAC recomenda o seguinte: 1,6% de nitrogênio, 8% de lipídios, 5% de água, 1% de fibra, 5% de cinzas, 1% de complexo vitamínico e sacarose ou amido q.s.p.

São determinados regularmente o consumo alimentar e o peso do animal, estabelecendo o valor médio do PER como o quociente de um ganho de peso por proteína consumida (equação 10).

$$PER = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{proteína consumida (g)}} \quad (10)$$

O PER pode ser corrigido multiplicando-se o PER da proteína teste consumida pelo seguinte fator: 2,5/por Caseína ANRC (pois se convencionou estabelecer que a caseína recebe o valor 2,5 e as demais dietas são corrigidas baseadas neste valor, conforme *American Nutrition Research Council*), sendo os dados expressos como porcentagem do valor de PER de caseína. Como o PER não é uma função linear, essa porcentagem não deve ser interpretada como equivalente do valor nutritivo da caseína.

A experiência tem demonstrado que o PER não é um método válido, já que dos critérios necessários para a validade de um ensaio biológico (precisão, reprodutibilidade, simplicidade, validade estatística, proporcionalidade e baixo custo), o PER só cumpre o de simplicidade (PELLETT, 1978 apud HERNÁNDEZ *et al.*, 1996; SAMONDS e HEGSTED, 1977). Os diversos estudos interlaboratoriais (HACKLER *et al.*, 1984, BURNETTE e RUSOLF, 1978; HACKLER, 1978) têm colocado em dúvida sua precisão.

O NPU, bem como o valor biológico e o PER, variam de acordo com a maior ou menor concentração de proteína na dieta, por isso convencionou-se que a concentração da mesma na dieta fosse fixada em 10% e, quando se trabalhar com níveis e concentrações protéicas diferentes daquelas do padrão, o NPU receberá o nome de operacional (NPU_{op}), o mesmo valendo para o PER (PER_{op}) (LEMONS, 1999).

5.12.1.6 Quociente de Eficiência Líquida de Proteína (NPR)

O método do NPR, desenvolvido por Bender e Doell (1957), possui resultados mais precisos e com maior reprodutibilidade que o método do PER, sendo uma modificação deste (VIROBEN e BERTRAND, 1985).

As características das dietas e dos animais são as mesmas que para o PER, porém é realizado em 10 dias e, além disso, inclui um grupo de animais alimentados com uma dieta aprotéica durante o período do ensaio. A perda de peso determinada nesse grupo é adicionada ao ganho de peso obtido no grupo alimentado com a proteína testada, conforme a equação 11 (HERNÁNDEZ *et al.*, 1996).

$$NPR = \frac{\text{ganho de peso (g)}_{\text{teste}} + \text{ganho de peso (g)}_{\text{aprotéico}}}{\text{proteína consumida (g)}} \quad (11)$$

Para reduzir as variações entre os ensaios, seu valor é expresso como um valor relativo (YOUNG e PELLET, 1978 apud HERNÁNDEZ *et al.*, 1996) em relação a uma proteína que assegure um máximo de crescimento, geralmente caseína (VIROBEN e BERTRAND, 1985).

5.12.1.7 Coeficiente de Eficiência Alimentar (FER)

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) ou Food Efficiency Ratio (FER) é dado pela razão entre o ganho de peso (g) e a quantidade de alimento ingerido (g) de cada animal ao final do experimento (GLÓRIA *et al.*, 2004; JOOD *et al.*, 1992).

– CAPÍTULO III –
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

CAPÍTULO III – ARTIGO 1:
BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E ÍNDICES BIOQUÍMICOS DE RATOS
ALIMENTADOS COM MULTIMISTURAS ACRESCIDAS DE *SPIRULINA PLATENSIS*

Resumo

A anemia ferropriva é a carência nutricional mais comum no mundo e entre suas causas, destaca-se a alimentação inadequada. A adição de multimistura à dieta tem sido estudada como potencial fonte de nutrientes. A microalga *Spirulina platensis* contém ferro e já mostrou ser eficiente regeneradora de hemoglobina em ratos. Este estudo avaliou a biodisponibilidade de ferro de multimisturas acrescidas de *Spirulina* através de avaliação biológica com 24 ratas *Wistar*. Após período de alimentação com dieta pobre em ferro, foram administradas 3 diferentes multimisturas e uma dieta controle aos animais: 1) Multimistura com farelo de arroz + 2% de *Spirulina* (MAS); 2) Multimistura com farelo de trigo + 2% de *Spirulina* (MTS); 3) Multimistura adotada pela Pastoral da Criança (MPC); 4) Dieta controle-caseína (DC). O farelo de arroz foi mais eficiente que o de trigo sobre o ganho de peso dos animais. As rações com *Spirulina* resultaram num superior ganho de peso dos animais em comparação à ração sem a alga. As multimisturas, comparadas à ração padrão, tiveram bons indicativos hematológicos e de desenvolvimento.

Palavras-chave: alimentação alternativa; biodisponibilidade de ferro; farelos; ratos; alga.

Summary

Iron deficiency anemia is the most prevalent nutritional need worldwide and among its causes, inadequate eating habits prevail. Multimix addition in diet has been studied as a potential nutrient source. The microalgae *Spirulina platensis* contains iron and has proved to be a good hemoglobin restorer in rats. This study evaluated iron bioavailability in multimixes added in with *Spirulina* by a biological assessment with 24 female *Wistar* rats. After administration of a diet lacking iron, the rats were fed 3 different multimixes and a control diet: 1) Multimix with rice oat + 2% of *Spirulina* (MAS); 2) Multimix with wheat oat + 2% of *Spirulina* (MTS); 3) Multimix adopted by the Child Pastoral (MPC); 4) Casein-based control diet (DC). Rice oat was more efficient than wheat oat over animal weight gain. *Spirulina* seems to be better regarding weight gain compared to diets without the algae. Multimixes, compared to control diet, presented satisfactory results with respect to development and hematologic parameters.

Key-words: alternative diet, iron bioavailability, oats, rats, algae

INTRODUÇÃO

A anemia por deficiência de ferro – anemia ferropriva – é a carência nutricional mais comum no mundo e afeta tanto países desenvolvidos como em desenvolvimento ²⁴. Crianças e mulheres em idade fértil, incluídas as gestantes, são os grupos que têm maior risco de desenvolver esta deficiência ¹³. No Brasil, estima-se que 35% das crianças de 1 a 4 anos têm anemia, o que significa quase 5 milhões de crianças anêmicas apenas nesta faixa etária ¹².

Não existem dados suficientes que possam indicar a exata dimensão da anemia no Brasil. Porém, alguns estudos realizados no Estado de São Paulo têm evidenciado que, apesar da diminuição da prevalência da desnutrição e da mortalidade infantil, continua havendo aumento da anemia ¹¹. A transição nutricional que se desenvolve no Brasil apresenta uma singularidade notável: o agravamento simultâneo de duas situações opostas por definição: uma carência nutricional (a anemia) e condições típicas dos excessos alimentares, como o sobrepeso e a obesidade ⁵.

Um dos principais fatores que contribuem para a alta prevalência de anemia é a alimentação inadequada, com ingestão precoce de leite de vaca e alimentos sólidos pobres em ferro, ingestão freqüente e excessiva de chá, baixa ingestão de carne e vitamina C. O aleitamento materno por mais de 6 meses sem suplementação de ferro além da baixa biodisponibilidade do mesmo nos alimentos que compõem a dieta também colabora para a manutenção deste quadro na infância ¹⁰.

A alimentação alternativa baseada na farinha conhecida como “multimistura” tem sido uma das estratégias de entidades filantrópicas como a Pastoral da Criança para o enfrentamento de problemas nutricionais. Teoricamente, essa proposta representa um aumento no valor nutricional da dieta, melhorando sua qualidade através da utilização de ingredientes de baixo custo e ricos em micronutrientes ⁸.

Sua formulação varia de acordo com a disponibilidade local de ingredientes, sendo composta de alimentos não convencionais na dieta, geralmente co-produtos de indústrias como farelos de trigo e arroz, além de casca de ovo, folhas verdes escuras e sementes.

A microalga *Spirulina platensis* contém uma quantidade significativa de ferro e seu poder como eficiente regeneradora de hemoglobina já foi verificado em ratos anêmicos. A alga apresenta uma mistura de nutrientes hematopoiéticos, contendo de 46 a 70% de proteína e sendo uma fonte rica em ácido fólico, vitamina B12, cobre, vitamina E e beta- caroteno ⁹.

A pesquisa de fontes não convencionais, econômicas e viáveis de ferro é uma importante estratégia para o combate à anemia nos países em desenvolvimento. A proposta deste estudo é avaliar multimisturas juntamente com a microalga *Spirulina* como fontes alternativas de ferro alimentar. Para tal, a alga foi acrescida às misturas compostas de diferentes farelos de cereais com o propósito de enriquecê-las com o mineral e, assim, avaliar sua disponibilidade *in vivo* utilizando ratos *Wistar* como modelo biológico.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Animais

Foram utilizados 24 ratas fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* cepa *Wistar*/UFPel, desmamadas aos 21 dias e com pesos entre 85 e 138g. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Matérias-primas

Para a confecção das multimisturas foram utilizadas como matéria-prima: farelo de trigo, farinha de milho, semente de girassol, pó de folha de mandioca, cascas de ovo e a microalga *Spirulina platensis*.

O farelo de trigo, a farinha de milho, a folha de mandioca em pó e as sementes de girassol foram adquiridas no comércio local. O farelo de arroz desengordurado foi fornecido por um engenho da região, as cascas de ovo foram cedidas por doceiras da cidade do Rio Grande e a microalga foi fornecida desidratada e na forma de espaguete pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Para a formulação das dietas controle e dieta para depleção de ferro, foram utilizados outros ingredientes para suprir as necessidades nutricionais dos animais, como caseína, sacarose, maltodextrina, amido de milho, óleo de soja, misturas de minerais e de vitaminas, além dos aminoácidos L-cistina e cloridrato de colina.

MÉTODOS

Preparo das matérias-primas

As multimisturas (MM) foram elaboradas no Laboratório de Bioquímica da FURG e, para a confecção das mesmas, foram obedecidas normas de higiene e

conservação para cada matéria-prima com o objetivo de eliminar ou diminuir a contaminação.

O procedimento empregado no preparo das matérias-primas seguiu o descrito por Feddern ⁷. Os farelos e a farinha de milho foram tostados em estufa com circulação de ar por 30 min a 130°C. As cascas de ovo foram lavadas em água corrente, fervidas em solução de ácido acético a 4% por 30 min, secas em estufa com circulação de ar por 1 h e 30 min a 130°C e moídas em moinho de facas a 18800 G por 1 min. A *Spirulina platensis* e a semente de girassol foram moídas em moinho de facas a 18800 G por 3 min. A folha de mandioca não sofreu pré-tratamento, pois já foi adquirida desidratada e em pó. Após, todas as matérias-primas foram peneiradas e separadas em duas frações de acordo com sua granulometria, sendo utilizadas para o preparo das MM as matérias-primas com granulometria igual ou inferior a 0,56 mm (Tyler 32).

Preparo das dietas

Foram confeccionadas 3 dietas compostas de multimistura e uma dieta controle (caseína). A ração Multimistura Pastoral da Criança (MPC) foi composta por 65% de farelo de trigo, 20% de farinha de milho, 5% de pó de folha de mandioca, 5% de pó de casca de ovo e 5% de pó de semente de girassol. As rações Multimistura Farelo de Arroz + *Spirulina* (MAS) e a Multimistura Farelo de Trigo + *Spirulina* (MTS) diferiram somente quanto ao farelo utilizado, sendo compostas de 68% de farelo de arroz (MAS) ou trigo (MTS), 20% de farinha de milho, 5% de pó de folha de mandioca, 5% de pó de casca de ovo e 2% de pó da microalga *Spirulina platensis*. A dieta controle (DC) foi elaborada conforme recomendação do Instituto Americano de Nutrição - AIN ^{15, 16}.

Após a mistura dos ingredientes das rações nas proporções adotadas, as dietas foram umedecidas com gel de amido a 8%, até atingir uma textura ideal para peletização manual, sendo secas em estufa com circulação de ar a 45°C por 20 h.

As rações foram confeccionadas semanalmente no Laboratório de Processamento de Alimentos da UFPel e oferecidas diariamente aos ratos.

Ensaio biológico

Foi realizado na sala de experimentação animal da Faculdade de Nutrição da UFPel e obedeceu às Normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e da Comissão de Ética da Universidade.

Inicialmente todos os animais (n=24) passaram por um período pré-experimental de 60 dias (período de depleção) em que receberam ração pobre em

ferro (SFe) visando a diminuição de seus níveis eritrocitários. Esta dieta foi elaborada conforme a Dieta Controle, apenas tendo sido eliminado o suplemento de ferro (cloreto férrico) de sua formulação.

Após o período de depleção, foi coletado sangue para análise de micro-hematócrito; as ratas foram pesadas e redistribuídas aleatoriamente, por sorteio, em 4 grupos de 6 animais, conforme dieta: 1) Multimistura com farelo de arroz + 2% de *Spirulina* (MAS); 2) Multimistura com farelo de trigo + 2% de *Spirulina* (MTS); 3) Multimistura adotada pela Pastoral da Criança (MPC); 4) Dieta controle-caseína (DC).

Durante o experimento, cada animal foi mantido em gaiola inoxidável individual, e cada grupo recebeu a ração tratamento por 21 dias, em quantidades de aproximadamente 15 g ao dia e água *ad libitum*, conforme recomendação para ratos adultos¹⁸. A temperatura ambiente foi mantida entre 21-25°C, umidade relativa do ar de 55-60% e ciclo claro-escuro automático de 12 h.

Hematologia

O sangue para realização das medidas de hematócrito durante o experimento foi coletado pela veia caudal através de tubos microcapilares heparinizados. A medida de hemoglobina foi feita semanalmente através de leitura no fotômetro portátil da marca HemoCue®¹, utilizando-se uma gota de sangue colocada em microcuvetas descartáveis.

Ao final do experimento, após terem sido submetidos a um jejum de 12 h, foi realizada uma sedação leve em câmara com éter etílico, sendo feita coleta de sangue por punção cardíaca. Uma gota de sangue foi destinada à medida de glicemia com o monitor Accu-Check Advantage II e o restante foi acondicionado em dois tipos de tubo *ependorf*, um com anticoagulante EDTA para determinação dos índices hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para análise dos índices bioquímicos. O plasma e o soro (com e sem EDTA, respectivamente) foram separados após submeter 3 mL de sangue à centrifugação por 8 min a 3500 rpm, e armazenado a -18°C. Os índices hematimétricos e dosagens do sangue total (hemograma) foram realizados no equipamento modelo Micros 60 da empresa ABX. As demais determinações foram feitas com kits da marca Labtest® no equipamento LabMax 240.

Determinação dos teores de ferro nas dietas

O ferro total foi determinado através de método colorimétrico utilizando fenantrolina/hidroxilamina^{2, 20} tendo suas absorbâncias lidas em espectrofotômetro UV-Visível (Varian® Cary 100 conc) em comprimento de onda de 510 nm. Os cálculos

foram realizados com base em curva padrão de ferro com concentração variando de 0 a 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) da média. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As dietas experimentais apresentaram os seguintes teores de ferro: MAS (4,7 mg/100 g); MTS (5,2 mg/100 g); MPC (4 mg/100 g) e DC (8 mg /100g); valores estes semelhantes aos encontrados por Barbosa *et al.*, 2006 (6,2 mg/100 g); Vizeu *et al.*, 2005 (entre 3,8 e 13,7 mg/100 g) e Santos *et al.*, 2004 (7,6 mg/100 g) para multimisturas, considerando-se a diferença de composição de cada formulação e a diferença de métodos analíticos utilizados ^{4, 19, 23}.

Mesmo após o período de 60 dias de depleção de ferro através de dieta deficiente no mineral (0,4 mg/100 g), os animais não apresentaram quadro clínico de anemia, tendo seus níveis de hemoglobina e hematócrito dentro do padrão normal para a espécie ^{17, 18}. Este fato pode ter ocorrido devido ao tempo de administração da dieta pobre em ferro não ter sido suficiente para depletar os estoques do mineral dos animais, uma vez que a anemia ferropriva é uma doença crônica, necessitando de um longo período de deficiência de ferro para que se apresente um quadro clínico de carência do mineral. No trabalho de Toiari *et al.* 2005 ²², a depleção deu-se desde a gestação dos animais, através de dieta deficiente em ferro para as ratas e conseqüente continuação desta após o desmame.

A Tabela 1 apresenta os valores de hemograma dos animais de acordo com a dieta ingerida.

Tabela 1. Valores médios de hemograma dos animais de acordo com a dieta ingerida.

	MAS* Média ± DP	MTS* Média ± DP	MPC* Média ± DP	DC* Média ± DP	P
Hemáceas 10 ⁶ /mm ³	5,3 ± 0,2 ^a	5,1 ± 0,6 ^a	5,2 ± 0,4 ^a	5,0 ± 0,3 ^a	0,77
Hemoglobina g/dL	13,4 ± 1,0 ^{ab}	11,6 ± 1,9 ^a	14,5 ± 0,6 ^b	13,9 ± 2,2 ^{ab}	0,03
Hematócrito %	30,8 ± 1,7 ^a	30,1 ± 4,1 ^a	30,1 ± 1,8 ^a	30,1 ± 1,4 ^a	0,95
VCM fL	58,2 ± 1,3 ^a	59,3 ± 1,0 ^a	58,3 ± 1,0 ^a	60,0 ± 1,7 ^a	0,20
HCM pg	22,7 ± 1,0 ^a	23,0 ± 2,0 ^a	23,4 ± 1,5 ^a	24,8 ± 2,7 ^a	0,47
CHCM g/dL	38,9 ± 1,7 ^a	39,1 ± 4,1 ^a	40,2 ± 2,0 ^a	41,1 ± 3,6 ^a	0,71
RDW %	13,8 ± 0,5 ^{ab}	12,7 ± 0,2 ^a	12,8 ± 0,8 ^a	14,4 ± 0,9 ^b	0,01

***MTS**: multimistura com farelo de trigo e *Spirulina*; **MAS**: multimistura com farelo de arroz e *Spirulina*;

MPC: multimistura pastoral da criança; **DC**: dieta controle (caseína).

DP: desvio-padrão.

Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Todos os valores encontrados no exame de hemograma estão dentro dos padrões de normalidade para ratos ¹⁸. Além disso, observou-se que apenas os índices de hemoglobina e RDW (distribuição de tamanho das células vermelhas) apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A anemia por deficiência de ferro geralmente está acompanhada de um RDW aumentado, o que indica eritrócitos heterogêneos em relação ao seu tamanho. O RDW deve sempre ser avaliado juntamente com o VCM (volume corpuscular médio), para que não haja erro de interpretação quando os dados são analisados separadamente ¹⁴. Estes índices devem ser avaliados em conjunto com os parâmetros mais utilizados para detecção da anemia (hematócrito, hemoglobina e hemácias) quando da alteração dos mesmos. Apesar do maior valor de RDW do grupo controle (DC) em relação aos grupos MTS e MPC, todos estão de acordo com os valores preconizados para a espécie ¹⁸. Os valores de VCM não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

A média de hemoglobina do grupo que ingeriu a multimistura pastoral da criança (MPC) foi significativamente maior que o grupo que se alimentou da multimistura de trigo e *Spirulina* (MTS). As duas dietas diferem na composição apenas pela troca da semente de girassol da MPC por *Spirulina* na MTS. Os demais grupos não apresentaram diferença significativa no valor de hemoglobina.

Analisando-se os valores de hemoglobina individualmente (dados não demonstrados), percebe-se que o resultado inferior do grupo MTS deve-se ao fato de apenas um dos animais deste grupo ter tido valor muito abaixo dos demais, alterando a média para baixo. Em ensaios biológicos a diferença inerente de cada organismo deve sempre ser considerada, pois os animais podem apresentar metabolismo

diferente interferindo nos resultados da pesquisa quando estes são avaliados como valores médios.

Kapoor & Mehta (1993) testaram o uso da *Spirulina* numa concentração bem superior a este estudo (24%) em associação com outros produtos vegetais e encontraram um valor de hemoglobina aumentado em ratas durante a gestação e lactação⁹. Este dado sugere que a adição da microalga numa concentração de 2% pode ser insuficiente para aumento do aporte de ferro.

Os resultados obtidos neste trabalho para a concentração de hemoglobina do grupo controle, dieta elaborada segundo a AIN 93, apresentam-se mais elevados do que os encontrados para o mesmo tipo de dieta por Toiaiari, 2005²² que foram de $13,9 \pm 2,2$ g/dL e $11,9 \pm 0,9$ g/dL, respectivamente.

De acordo com Ringler e Dabich, 1979¹⁷ a variação da concentração de hemoglobina em ratos, na ordem de 11,4 g/dl a 19,2 g/dl, está condicionada à raça, idade, sexo e estado de saúde do animal.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos minerais no soro das ratas estudadas.

Tabela 2. Média dos minerais séricos dos grupos experimentais.

	MAS*	MTS*	MPC*	DC*	p
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Minerais séricos					
Ferro µg/dL	455,8 ± 30,3 ^a	506,5 ± 159,9 ^a	493,7 ± 180,2 ^a	399,8 ± 88,3 ^a	0,50
Cálcio mg/dL	10,3 ± 0,4 ^a	10,2 ± 1,8 ^a	10,8 ± 0,6 ^a	10,6 ± 0,4 ^a	0,71
Magnésio mg/dL	2,5 ± 0,3 ^a	2,6 ± 0,6 ^a	2,5 ± 0,3 ^a	2,6 ± 0,2 ^a	0,10
Fósforo mg/dL	8,1 ± 2,8 ^a	8,2 ± 2,4 ^a	7,2 ± 1,6 ^a	7,4 ± 2,2 ^a	0,84
Sódio mEq/L	128,4 ± 7,2 ^a	127,3 ± 21,4 ^a	126,5 ± 10,8 ^a	131,7 ± 6,7 ^a	0,90
Potássio mEq/L	6,9 ± 3,4 ^a	6,7 ± 3,2 ^a	6,6 ± 2,8 ^a	7,0 ± 3,7 ^a	0,10
Cloro mEq/L	90,0 ± 4,2 ^a	88,5 ± 15,2 ^a	87,0 ± 8,2 ^a	92,2 ± 6,5 ^a	0,80

*MTS: multimistura com farelo de trigo e *Spirulina*; MAS: multimistura com farelo de arroz e *Spirulina*; MPC: multimistura pastoral da criança; DC: dieta controle (caseína). DP: desvio-padrão. Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Semelhante aos estudos de Santos e Madruga (2004) e Bion e Pessoa (1997), neste estudo a suplementação com multimistura não resultou em diferença nos níveis séricos de ferro e valores de hematócrito^{6, 19}. Os demais minerais séricos analisados também se apresentaram dentro da normalidade para a espécie e não diferiram significativamente entre os grupos (Tabela 2). Siqueira et al. investigaram a

biodisponibilidade de cálcio, ferro e zinco em ratas alimentadas com multimisturas e encontraram uma boa resposta, demonstrando que os fitatos presentes não inibiram a absorção desses nutrientes ²¹.

Apesar de a hemoglobina ser um parâmetro aceito mundialmente para definição de anemia, sabe-se que é um indicador de baixa sensibilidade e especificidade para avaliação do estado nutricional de ferro ³. Deste modo, a análise mais completa do hemograma dos ratos alimentados com as diferentes dietas, buscando-se determinar os valores de RDW e VCM (volume corpuscular médio) permitiu uma resposta mais segura para o ensaio biológico.

Boaventura *et al.* (2003) estudaram os efeitos da suplementação da dieta habitual de Quissamã, R.J. e de uma dieta padrão sobre o peso, hemoglobina e hematócrito de ratos. Foram adicionados dois tipos de suplemento nas dietas: vitaminas + minerais (VM) e multimistura (MM) com composição modificada. Para a hemoglobina, verificou-se que os maiores valores foram encontrados nos animais alimentados com dieta padrão suplementados com MM, não diferindo entre os que ingeriram a dieta de Quissamã com as diferentes suplementações. O hematócrito diferiu somente no grupo alimentado com dieta padrão adicionada de VM, sendo menor que nos demais. Em relação ao ganho de peso, o grupo dieta padrão com MM apresentou o menor valor, sendo estatisticamente diferente de todos os outros grupos.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, há indicação da viabilidade de utilização da multimistura como uma estratégia na prevenção da anemia ferropriva e como fonte dietética de minerais, uma vez que as respostas biológicas à mesma, como componente da dieta de ratos e não como complemento, como é utilizada, se assemelham às obtidas na dieta padrão para a espécie em estudo.

A adição de *Spirulina* a 2% não resultou em diferenças nos índices bioquímicos dos animais. Como já foi observado anteriormente, uma concentração mais alta da alga pode provavelmente resultar em melhoras significantes dos índices sanguíneos.

De forma geral, apesar das controvérsias existentes em torno do assunto alimentação alternativa, se elaboradas de forma adequada as multimisturas podem somar nutrientes a dietas carentes. Prova disso é que neste estudo as dietas de multimistura apresentaram um bom desempenho frente a uma dieta padrão em termos hematológicos e de desenvolvimento. Certamente deve-se ter cautela ao extrapolar resultados de um estudo realizado em animais para humanos, dadas as diferenças de

metabolismo entre as espécies, fazendo-se necessário estudar a eficácia destas dietas no organismo humano.

REFERÊNCIAS

1. HemoCue: Blood Hemoglobin Photometer. Operating Manual. Acesso em: Junho de 2007. Disponível em: http://www.hemocue.com/files/900138_GB.pdf
2. American Association of Cereal Chemists (AACC). Approved Methods of the AACC. Iron-Spectrophotometric Method (40-41b). St Paul, MN. 1995; 9th ed.
3. Alferez MJM, Lopez-Aliaga I, Nestares T, Diaz-Castro J, Barrionuevo M, Ros PB, et al. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropenic anaemia in comparison with cow milk. *International Dairy Journal*. 2006;16:813-21.
4. Barbosa CdO, Lopes IBdM, Morgano MA, Araújo MAdM, Moreira-Araújo RSdR. Conteúdo de Minerais dos Ingredientes da Multimistura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2006;26(4):916-20.
5. Batista Filho M, de Souza AI, Miglioli TC, dos Santos MC. [Anemia and obesity: a paradox of the nutritional transition in Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2008;24 Suppl 2:S247-57.
6. Bion FM, Pessoa DC, Lapa MA, Campos Fde A, Antunes NL, Lopes SM. [The use of a multimix as a dietary supplement: study in rats]. *Archivos latinoamericanos de nutricion*. 1997 Sep;47(3):242-7.
7. Feddern V. Influência da Composição e da Fermentação na Biodisponibilização de Nutrientes em Multimisturas [Dissertação]. Rio Grande: Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG); 2007.
8. Gigante DP, Buchweitz M, Helbig E, Almeida AS, Araujo CL, Neumann NA, et al. Randomized clinical trial of the impact of a nutritional supplement "multimixture" on the nutritional status of children enrolled at preschools. *Jornal de pediatria*. 2007 Jul-Aug;83(4):363-9.
9. Kapoor R, Mehta U. Effect of supplementation of blue green alga (Spirulina) on outcome of pregnancy in rats. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*. 1993 Jan;43(1):29-35.
10. Lozoff B, Jimenez E, Hagen J, Mollen E, Wolf AW. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics*. 2000 Apr;105(4):E51.
11. Monteiro CA, Szarfarc SC, Mondini L. [Secular trends in childhood in the city of Sao Paulo, Brazil (1984-1996)]. *Revista de saude publica*. 2000 Dec;34(6 Suppl):62-72.
12. Mora JO, Mora LM. Deficiencias de micronutrientes en América Latina Y el Caribe: anemia ferropriva. . In: Salud OPdL, ed.: Organización Panamericana de La Salud. Washington (DC): 1997.

13. Neuman NA, Tanaka OY, Szarfarc SC, Guimaraes PR, Victora CG. [Prevalence and risk factors for anemia in Southern Brazil]. *Revista de saude publica*. 2000 Feb;34(1):56-63.
14. Paiva AA, Rondó P, Guerra-Shinohara EM. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. *Revista de saude publica*. 2000;34(4):421-6.
15. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *The Journal of nutrition*. 1997 May;127(5 Suppl):838S-41S.
16. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. 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. *The Journal of nutrition*. 1993 Nov;123(11):1939-51.
17. Ringler D, Dabich L. Hematology and Clinical Biochemistry. In: *The Laboratory Rat*. San Diego: Academic Press 1979.
18. Sanchis FS, Silbiger HLN. Animais de Laboratório. *Purina Alimentos*. 1986:12-4.
19. Santos HB, Madruga MS, Bion FM, Antunes NLM, Mendes K, Águida R. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2004;24(4):613-8.
20. Silva CA, Paschoal LR. Análise simultânea dos teores de Fe²⁺ e Fe³⁺ em formulações de sulfato ferroso. *Revista Interação*. 2003 may;7(7).
21. Siqueira EM, Arruda SF, de Sousa LM, de Souza EM. Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats. *Archivos latinoamericanos de nutricion*. 2001 Sep;51(3):250-7.
22. Toiari SDA, Yuyama LKO, Aguiar JPL, Souza RFS. Iron bioavailability of the açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and the iron-fortified manioc flour in rats. *Rev Nutr*. 2005;18(3):291-9.
23. Vizeu VE, Feijó MBS, Campos RCd. Determinação da Composição Mineral de Diferentes Formulações de Multimistura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2005;25(2):254-8.
24. WHO. Iron deficiency anemia: assessment, prevention, and control: a guide for program managers. In: Organization WH, ed.: WHO, Geneva 2001.

CAPÍTULO III – ARTIGO 2: AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE DIETAS COMPOSTAS DE FARELOS DE CEREAIS E SPIRULINA

INTRODUÇÃO

Apesar de o Brasil estar passando por um processo de transição nutricional, a desnutrição continua como um problema de saúde pública de grande prevalência num país com tanta disparidade social (Batista Filho e Rissin, 2003).

Ao longo das últimas décadas, uma série de trabalhos (Monteiro et al., 2000) evidenciou a variedade de agravos nutricionais e a complexidade dos fatores causais envolvidos na desnutrição. Isso traz grandes desafios para a execução de políticas que contemplem necessidades tão heterogêneas, entretanto os modelos de intervenção tradicionalmente implementados privilegiam apenas um fator envolvido no processo causal.

Esta também é a concepção para o uso da alimentação alternativa, pois entende que os problemas são essencialmente decorrentes de uma inadequação no consumo de alimento, sendo então sua principal atividade o provimento do mesmo, para corrigir ou compensar os principais nutrientes que são fornecidos de forma inadequada pela dieta (Bittencourt, 1998).

A alimentação alternativa baseada na farinha conhecida como multimistura tem sido uma das estratégias da Pastoral da Criança para o enfrentamento de problemas nutricionais de determinados grupos populacionais. Teoricamente, essa proposta representa um aumento no valor nutricional da dieta, melhorando sua qualidade através da utilização de ingredientes de baixo custo e ricos em nutrientes (Gigante et al., 2007).

A qualidade nutricional da proteína varia com sua origem. As proteínas de origem vegetal são de baixo valor biológico, principalmente porque são deficientes em alguns aminoácidos essenciais, ou a relação entre eles é desequilibrada. Na luta contra a falta de proteínas, vários autores exaltam a importância do aproveitamento das folhas na alimentação humana, frisando as possibilidades que essa matéria-prima, atualmente pouco utilizada e praticamente desperdiçada, pode oferecer como fonte protéica (Pechnick et al., 1962 citado por Boaventura et al., 2000).

A *Spirulina platensis* é uma microalga que vem chamando atenção de pesquisadores e indústrias devido às suas propriedades nutricionais e antioxidantes. Seu conteúdo protéico varia entre 50 e 74% de seu peso seco e é formado por proteínas completas do ponto de vista qualitativo, uma vez que contém todos os

aminoácidos essenciais. Esse nível é muito elevado, mesmo entre microrganismos (Henrikson et al., 1994; Vonshak, 1997).

Este trabalho tem como objetivo avaliar nutricionalmente, através de indicativos biológicos e índices bioquímicos, multimisturas à base de farelos de cereais acrescidas da microalga *Spirulina platensis* utilizando ratas *Wistar* como modelo biológico.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Animais

Foram utilizados para o experimento, ratas fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* cepa *Wistar/UFPEL*, desmamadas aos 21 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas.

Matérias-primas

Para a confecção das multimisturas foram utilizadas matérias-primas como farelo de trigo, farelo de arroz desengordurado, farinha de milho, semente de girassol, pó de folha de mandioca, cascas de ovo e a microalga *Spirulina platensis*. O farelo de trigo, a farinha de milho, a folha de mandioca em pó e as sementes de girassol foram adquiridas no comércio local. O farelo de arroz desengordurado foi fornecido por um engenho da região, as cascas de ovo foram cedidas por doceiras da cidade do Rio Grande e a microalga foi fornecida desidratada e na forma de espaguete pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Para a confecção das dietas aprotéica e controle, foram utilizados outros ingredientes como caseína, sacarose, maltodextrina, amido de milho, óleo de soja, misturas de minerais e de vitaminas, além dos aminoácidos L-cistina e cloridrato de colina.

MÉTODOS

Preparo das dietas

Foram preparadas 3 diferentes rações contendo multimisturas, além de uma dieta controle e uma aprotéica, designadas da seguinte forma: 1) Multimistura com farelo de arroz + 2% de spirulina (MAS); 2) Multimistura com farelo de trigo + 2% de

spirulina (MTS); 3) Multimistura adotada pela Pastoral da Criança (MPC); 4) Dieta controle-caseína (DC) formulada de acordo com o Instituto Americano de Nutrição - AIN (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993; Reeves, 1997) e 5) Dieta Aprotéica (DA), preparada conforme à padrão porém sem adição da fonte protéica (caseína).

A ração Multimistura Pastoral da Criança (MPC) foi composta por 65% de farelo de trigo, 20% de farinha de milho, 5% de pó de folha de mandioca, 5% de pó de casca de ovo e 5% de pó de semente de girassol. As rações Multimistura Farelo de Arroz + *Spirulina* (MAS) e a Multimistura Farelo de Trigo + *Spirulina* (MTS) diferiram somente quanto ao farelo utilizado, sendo compostas de 68% de farelo de arroz (MAS) ou trigo (MTS), 20% de farinha de milho, 5% de pó de folha de mandioca, 5% de pó de casca de ovo e 2% de pó da microalga *Spirulina platensis*.

As dietas foram elaboradas com o objetivo principal de serem isoprotéicas para melhor avaliação dos indicadores de qualidade nutricional das dietas. Para tanto, foram colocados ingredientes adicionais, como amido e óleo de soja, às multimisturas para que a diferença protéica entre elas fosse minimizada e também para que ficassem com composição mais próximas à dieta padrão.

Para administração das dietas aos animais, as rações foram umedecidas com gel de amido a 8%, até atingir uma textura ideal para peletização manual, sendo os peletes secos em estufa com circulação de ar a 45°C por 20h.

Ensaio biológico

O ensaio biológico foi desenvolvido em duas fases, durante 42 dias, com 30 ratas Wistar. Na primeira fase denominada de desnutrição, todos os animais receberam dieta aprotéica durante 21 dias, quando constatada desnutrição protéica através de perda de peso, de pêlos e diminuição das proteínas plasmáticas.

Na segunda fase, chamada de recuperação, os animais foram distribuídos em 5 grupos de 6 animais, da seguinte forma: grupo aprotéico (GA), com dieta isenta de proteínas, grupo controle (GC) alimentado com ração à base de caseína, grupo multimistura à base de farelo de arroz + 2% spirulina (MAS), grupo multimistura à base de farelo de trigo + 2% de spirulina (MTS) e grupo multimistura Pastoral da Criança (MPC).

Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de aço inox, em ambiente com temperatura e iluminação controladas. A água foi ofertada *ad libitum* e a ração em quantidade de aproximadamente 15g ao dia, sendo o peso registrado semanalmente e o consumo registrado diariamente.

A fase de recuperação durou 21 dias e ao final deste período, as ratas foram pesadas, colocadas em jejum de 12 horas e sedadas uma a uma, de acordo com os

blocos sorteados, em câmara com éter etílico. Foi retirado sangue, por punção cardíaca, para dosagem imediata da glicemia e para posterior determinação de outros índices bioquímicos.

Em seguida, os animais sofreram eutanásia por aprofundamento anestésico e foram abertos ventralmente para retirada de órgãos como baço, rins e fígado. Os órgãos foram lavados em solução fisiológica gelada, enxutos em papel filtro, e pesados em balança semi-analítica (200 g, com precisão de 0,01 g).

O ensaio foi realizado na sala de experimentação animal da Faculdade de Nutrição da UFPel e obedeceu às Normas do COBEA e da Comissão de Ética da Universidade.

Determinações bioquímicas

O sangue para realização da medida de proteínas plasmáticas (PPT) durante o experimento foi coletado pela veia caudal através de tubos microcapilares heparinizados. A medida foi feita através de centrifugação dos microcapilares, onde o plasma foi separado das células sanguíneas e posteriormente realizada leitura em refratômetro (Kaneko, 1989).

Ao final do experimento, retirou-se sangue para teste direto de glicemia com o aparelho Advantage Lilly® e para determinação de índices bioquímicos (albumina, proteínas plasmáticas totais, colesterol total e triacilgliceróis). O sangue foi acondicionado em tubos *ependorf* com anticoagulante EDTA para realização dessas dosagens, que foram feitas com kits da marca Labtest® no equipamento LabMax 240.

Determinação da composição proximal

Foram realizadas determinações, em duplicata, de umidade, lipídios, cinzas, fibras e proteínas nas dietas de multimisturas, caseína e aprotéica segundo método oficial (AOAC, 2000), sendo os carboidratos calculados por diferença. Para as excretas, foram determinadas apenas as proteínas. O fator utilizado para conversão do nitrogênio em proteína foi 6,25 para todas as dietas e excretas.

Avaliação da qualidade nutricional das dietas

A eficácia das dietas foi avaliada através do Coeficiente de Eficiência Alimentar – FER (ganho de peso/dieta total ingerida); Razão de Eficiência Líquida Protéica – NPR (ganho peso grupo estudo + ganho peso grupo aprotéico/ proteína consumida); Razão de Eficiência Protéica – PER (ganho de peso/proteína consumida) e Digestibilidade verdadeira *in vivo* – DV ((N consumido-N excretado grupo estudo – N

excretado grupo aprotéico)/N consumido) (Miller e Bender, 1955; Jood et al., 1993; Sgarbieri, 1996 ; Hernández et al., 1996).

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentados os valores da composição proximal das dietas formuladas.

Tabela 1. Composição proximal das dietas experimentais após preparo dos peletes.

	MAS*	MTS*	MPC*	DC*	AP*
Umidade %	8,7	3,4	2,9	7,5	8,8
Cinzas %	7,9	3,6	3,4	3,2	3,3
Proteína %	11,7	11,0	11,1	11,1	1,1
Lipídios %	10,7	11,2	11,3	11,0	10,5
Fibras %	6,0	5,6	5,6	0,7	0,4
Carboidratos %	55,0	65,2	65,7	66,5	75,9

*MTS: multimistura com farelo de trigo e *Spirulina*; MAS: multimistura com farelo de arroz e *Spirulina*; MPC: multimistura pastoral da criança; DC: dieta controle (caseína); AP: dieta aprotéica.

Os valores encontrados para fibras e proteína se assemelham ao estudo de Madruga e Câmara (2000) que avaliaram a composição química de uma multimistura e seus constituintes. Os valores de cinzas destes autores também se assemelham aos do presente estudo em relação às dietas que continham farelo de trigo (MTS e MPC). Porém, verifica-se que a dieta com farelo de arroz (MAS) possui maior quantidade de minerais. A diferença na composição química das multimisturas em diversos estudos se deve às diferentes formulações, pois seus ingredientes e as quantidades adicionadas variam de acordo com os produtos disponíveis nas regiões do Brasil.

Azeredo et al. (1999) estudaram duas composições de multimistura com diferentes farelos, de trigo e de arroz, e encontraram altos teores de lipídios e minerais na multimistura com farelo de arroz. No presente estudo, utilizou-se farelo de arroz desengordurado, pois além de ser um resíduo industrial, possui menor teor lipídico, possibilitando a padronização do conteúdo lipídico entre todas as dietas.

Azeredo et al. (2000) obtiveram 12% de proteína, 8,8% de lipídios e 2,5% de minerais para a composição proximal da dieta à base de caseína e Leite et al. (2002) encontrou valores semelhantes para esta dieta: 12,4% de proteína, 7,2% de lipídios e 2,6% de cinzas. Estes valores são semelhantes aos encontrados no presente estudo se levadas em consideração as adaptações para igualdade de composição entre as

dietas; com exceção dos minerais, que foram ligeiramente mais baixos nas dietas dos autores. Souza et al. (2006), obteve valores muito semelhantes aos deste estudo para a composição proximal de suas dietas à base de multimisturas.

Na tabela 2 são apresentadas as médias do ganho de peso dos grupos durante o experimento, os indicativos de qualidade nutricional e a porcentagem da relação dos órgãos com o peso corporal das ratas.

Tabela 2. Médias de pesos iniciais e finais, ganhos de peso, indicativos biológicos e relações peso órgão/peso corporal dos grupos experimentais.

	MAS* Média ± DP	MTS* Média ± DP	MPC* Média ± DP	DC* Média ± DP
Peso inicial (g)	164,0 ± 8,5 ^a	164,0 ± 7,3 ^a	163,5 ± 9,8 ^a	163,3 ± 10,0 ^a
Peso final (g)	225,8 ± 13,0 ^a	209,8 ± 9,1 ^{ab}	199,5 ± 11,6 ^b	228,5 ± 22,5 ^a
Ganho de peso (g)				
7 dias	30,7 ± 7,5 ^a	23,3 ± 3,8 ^{ab}	21,2 ± 4,2 ^d	41,2 ± 3,6 ^c
14 dias	55,8 ± 4,5 ^a	41,0 ± 4,9 ^b	32,0 ± 6,3 ^d	64,0 ± 13,8 ^a
21 dias	61,8 ± 4,9 ^a	45,8 ± 8,7 ^{ab}	36,0 ± 5,1 ^b	64,2 ± 20,7 ^a
FER**	0,22 ± 0,0 ^a	0,15 ± 0,0 ^b	0,13 ± 0,0 ^b	0,22 ± 0,0 ^a
PER**	2,0 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,3 ^b	1,1 ± 0,2 ^b	2,0 ± 0,4 ^a
NPR**	1,7 ± 0,2 ^{ab}	1,1 ± 0,2 ^{bc}	0,7 ± 0,3 ^c	2,3 ± 0,8 ^a
DV**	61,5 ± 9,5 ^a	52,3 ± 6,4 ^{ab}	50,6 ± 0,6 ^b	89,2 ± 1,4 ^c
Órgãos/corpo (g/100g)				
Fígado	3,5 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,5 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,3 ^a
Baço	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,3 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a
Rins	0,8 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,2 ^a

***MTS**: multimistura com farelo de trigo e *Spirulina*; **MAS**: multimistura com farelo de arroz e *Spirulina*; **MPC**: multimistura pastoral da criança; **DC**: dieta controle (caseína).

DP: desvio-padrão.

** **FER**: Coeficiente de Eficiência Alimentar ; **PER**: Razão de Eficiência Protéica; **NPR**: Razão de Eficiência Líquida Protéica; **DV**: Digestibilidade verdadeira.

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística pelo teste Tukey (p<0,05).

O ganho de peso dos animais foi avaliado semanalmente. A média de peso de todos os grupos era semelhante no início do tratamento (Tabela 2), o que facilitou a visualização do ganho ponderal ao longo do experimento.

Em todos os grupos o maior ganho de peso deu-se na última semana. Nos primeiros 7 dias, o grupo controle apresentou o maior ganho de peso, diferindo estatisticamente dos demais grupos. A multimistura contendo farelo de arroz (MAS) promoveu ganho de peso maior que a multimistura pastoral (MPC) (p=0,02), mas não diferiu da multimistura com farelo de trigo e adição da microalga *Spirulina* (MTS). Esse dado denota que a substituição da semente de girassol pela microalga foi benéfica no sentido que foi somente esta a variação na composição entre as rações MPC e MTS.

Na segunda semana o grupo MAS teve ganho ponderal semelhante ao grupo padrão (DC) ($p=0,35$). Os ganhos de peso dos grupos MTS e MPC não diferiram estatisticamente e foram menores que os dos grupos DC e MAS.

Na última semana do experimento, o ganho de peso dos grupos MAS, MTS e DC igualaram-se. O grupo MPC teve ganho ponderal estatisticamente igual ao grupo MTS e inferior aos demais ($p<0,001$). Apesar de não ter apresentado diferença significativa ($p=0,49$), a ração contendo farelo de trigo e *Spirulina* (MTS) promoveu maior ganho ponderal que sua semelhante sem a microalga (MPC) e não diferiu das dietas MAS e DC.

Houve diferença no peso final dos animais entre as dietas testadas, sendo significativa entre as dietas MAS e MPC e entre MPC e DC. A dieta MPC resultou no menor ganho de peso em comparação com as dietas MAS e DC. O consumo absoluto de ração em cada grupo foi semelhante, ficando em torno de 13 g/ grupo/ dia.

Estes achados demonstram que o farelo de arroz foi mais eficiente que o de trigo em promover ganho de peso nos animais, o que foi confirmado pelos resultados do coeficiente de eficácia alimentar (FER) e quociente de eficiência protéica (PER) das dietas, sendo que a ração MAS teve estes valores idênticos ao da dieta padrão. A dieta com farelo de trigo e *Spirulina* teve estes coeficientes ligeiramente superiores à dieta pastoral, porém estes não diferiram estatisticamente. Em relação ao PER da caseína, as dietas MAS, MTS e MPC apresentaram, respectivamente, eficiência de 99,3%; 69,5% e 57,0%, ou seja, foram aproveitadas biologicamente nessa proporção em comparação à caseína. Este fato demonstra que a qualidade protéica das dietas contendo multimistura com farelo de trigo foi inferior as dietas caseína e multimistura com farelo de arroz. Isto foi também observado por Boaventura et al. (2000), que encontraram nas multimisturas avaliadas uma correspondência de 66,04% do PER da caseína. O valor do PER da caseína (2,2) está abaixo do encontrado por Boaventura et al. (2000), de 3,79; mas próximo ao valor citado por Ferreira et al. (2005), de 2,53.

Como o NPR é um indicativo biológico que leva em consideração a perda de peso do grupo aprotéico, ele é mais fidedigno do que o PER. Neste estudo, o valor de NPR foi maior para o grupo DC, mas não diferiu estatisticamente do grupo MAS. Por sua vez, o grupo MAS não diferiu do MTS, sendo que todos os grupos obtiveram valores significativamente superiores de NPR ao grupo MPC. A perda de peso do grupo submetido à dieta aprotéica, durante 14 dias, foi de 17,0 g, valor este que está somado ao ganho de peso dos demais grupos, nos dados de NPR.

O valor de NPR encontrado para caseína (2,3) foi semelhante aos valores encontrados por Glória et al. (2004), de 2,76 e por Costa et al. (1996a) citado por Boaventura et al. (2000); de 2,73, mas inferior ao valor de 4,78, determinado por

Boaventura et al. (2000); 4,22, encontrado por Monteiro et al., (2004) e 3,7, determinado por Souza et al. (2006).

Analisando-se o NPR das multimisturas proporcionalmente à padrão, observa-se que os grupos alimentados com as dietas MAS, MTS e MPC apresentaram valores de 72,7%, 47,2% e 31,1%, respectivamente, comprovando que a qualidade biológica da proteína da dieta do grupo controle foi superior a das dietas contendo multimistura, em especial as formulações à base de farelo de trigo.

A caseína apresentou digestibilidade verdadeira de 89,2%, estando abaixo dos valores encontrados por Souza et al. (2006), de 96,4% e Monteiro et al. (2004), de 96,8%, todos utilizando ratos da cepa *Wistar* como modelo biológico.

Assim como os demais indicativos de qualidade nutricional, a digestibilidade *in vivo* da multimistura contendo farelo de arroz (MAS) apresentou maior valor que as com farelo de trigo (MTS e MPC), porém as duas dietas com adição de *Spirulina* não diferiram estatisticamente entre si. Os grupos MAS, MTS e MPC apresentaram 68,9%, 58,6% e 56,7%, respectivamente, da digestibilidade verdadeira da caseína. Isso pode ser explicado pelo fato da excreção fecal ser maior nos grupos alimentados das dietas com multimistura devido à maior quantidade de fibras nessas dietas que na padrão; o que influencia diretamente no cálculo da digestibilidade. Levando-se em conta que as proteínas vegetais possuem digestibilidade inferior às animais, como a caseína, os valores encontrados para as multimisturas podem ser considerados satisfatórios (Sgarbieri, 1996).

A relação peso corporal/peso dos órgãos foi feita com o objetivo de detectar quaisquer alterações de tamanho que pudesse indicar alguma patologia, levando-se em conta a proporção dos órgãos em relação ao peso dos animais.

Não houve diferença estatisticamente significativa no percentual da relação peso corporal e peso dos órgãos testados, o que indica que as relações entre os pesos dos órgãos com os pesos corporais dos animais são proporcionais e, portanto, que as dietas de multimistura não tiveram efeitos deletérios para esses órgãos, analisando-se este indicador. Os valores estão de acordo com os encontrados por Vijayalakshmi (Vijayalakshmi, Muthulakshmi *et al.*, 2000).

Na tabela 3 são demonstrados os valores de proteínas no plasma, além de colesterol total, triglicérides e glicose no sangue dos animais ao final do experimento.

Tabela 3. Índices bioquímicos dos grupos experimentais.

	MAS*	MTS*	MPC*	DC*
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Proteínas plasmáticas				
Proteínas totais g/dL	5,9 ± 0,4 ^a	5,7 ± 1,1 ^a	5,8 ± 0,5 ^a	6,2 ± 0,6 ^a
Albumina g/dL	3,1 ± 0,2 ^a	3,0 ± 0,5 ^a	3,1 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,2 ^a
Colesterol total mg/dL	49,3 ± 6,7 ^a	64,5 ± 18,2 ^a	70,2 ± 12,3 ^a	70,5 ± 19,2 ^a
Triacilgliceróis mg/dL	45,8 ± 12,8 ^a	61,0 ± 20,4 ^a	51,5 ± 12,9 ^a	49,5 ± 5,9 ^a
Glicemia mg/dL	107,0 ± 16,4 ^a	88,7 ± 25,6 ^a	98,7 ± 29,2 ^a	125,0 ± 31,9 ^a

***MTS**: multimistura com farelo de trigo e *Spirulina*; **MAS**: multimistura com farelo de arroz e *Spirulina*;

MPC: multimistura pastoral da criança; **DC**: dieta controle (caseína).

DP: desvio-padrão.

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

As proteínas plasmáticas totais (PPT) e, mais especificamente, a albumina plasmática são boas indicadoras do estado nutricional e, neste caso, os valores de ambos índices apresentam-se dentro dos padrões de normalidade para a espécie em estudo (Sanchis e Silbiger, 1986). Tanto os valores para as PPT como para a albumina foram muito semelhantes entre si e não houve diferenças significativas entre os grupos, indicando que as multimisturas foram eficientes na nutrição dos animais. Santos et al. (2004) encontraram valores de PPT de 5,53 g/dL para a dieta caseína e 4,88 g/dL para uma dieta creche suplementada com multimistura, valores inferiores ao encontrados no presente estudo. Para a albumina, os autores encontraram 3,01 g/dL para a dieta caseína e 2,68 g/dL para a dieta suplementada com multimistura.

Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa para as dosagens de colesterol total, provavelmente pela heterogeneidade de alguns grupos denotada pelo maior desvio padrão; nota-se que o grupo MAS obteve o menor valor. Este fato pode ser atribuído à presença de um componente antioxidante presente no farelo de arroz, o oryzanol, que já teve seu efeito hipocolesterolêmico comprovado em alguns estudos (Kahlon e Chow, 2000). A microalga *Spirulina* também contém componentes antioxidantes como ficocianina e compostos fenólicos que estão ligados à diminuição do colesterol sanguíneo. No estudo realizado por Colla et al. (2008), coelhos foram alimentados com dietas ricas em colesterol e obtiveram decréscimo de seus níveis da lipoproteína no sangue quando alimentados com dietas acrescidas de 0,5 g de *Spirulina* por dia.

Assim como para o colesterol, os valores de triacilgliceróis (TG) não diferiram significativamente entre os grupos em estudo, sendo que o grupo MAS teve valor inferior aos demais. Todos os resultados de TG encontrados foram inferiores aos obtidos por Azeredo et al. (2003) em ratas gestantes.

A glicemia das ratas do grupo padrão e do grupo MAS apresentaram os valores mais elevados, apesar de não ter ocorrido diferença significativa entre nenhum dos grupos do experimento. Porém pode-se perceber um leve efeito hipoglicêmico dos grupos alimentados com multimisturas à base de farelo de trigo. Todos os grupos apresentaram valores de glicemia normais para a espécie (50 mg/dL a 135 mg/dL) (Harkness e Wagner, 1993).

CONCLUSÃO

De modo geral, pode-se concluir que as dietas de multimistura adicionadas de *Spirulina* apresentaram um bom desempenho frente a uma dieta padrão, uma vez que ocasionaram ganho de peso semelhantes a essa.

A dieta com farelo de arroz (MAS) foi mais eficiente que as com farelo de trigo (MTS e MPC) em relação à eficiência alimentar e protéica. As multimisturas contendo *Spirulina* (MAS e MTS) ocasionaram um maior ganho de peso do que a multimistura sem adição da mesma (MPC).

No que diz respeito aos índices bioquímicos estudados, tanto o grupo alimentado com dieta padrão quanto os grupos alimentados com dietas de multimistura apresentaram valores normais para a espécie em estudo e sem diferença estatística entre si.

REFERÊNCIAS

AOAC – Association of Official Analytical Chemists (2000). Official Methods of Analysis, 17th edn. Washington, DC: AOAC (CD-ROM).

Azeredo, V. B. de.; Boaventura, G. T.; Carmo, M. das G. T. do. Study of chemical characteristics and nutritional quality of two food - subproduct flour - multimixture. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 2, Health Module. 145, Mar 1999. 4p.

Azeredo, V.B., Boaventura, G.T., Tavares Do Carmo, M.G. Apparent digestibility and proteic quality of basic diet of Rio de Janeiro State complemented with multimixture. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.51, n.6, p.453-458, 2000.

Azeredo, V.B. de.; Dias, M.M.; Boaventura, G.T.; Carmo, M. das G. T. do; Fernandes, N.R. Influência da multimistura na gestação de ratas: pesos materno e fetal e triglicérides séricos. **Rev. Nutr., Campinas**, 16(1):83-91, jan./mar., 2003.

Batista-Filho, M., Rissin, A. A transição nutricional no Brasil: Tendências regionais e temporais. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19(Sup. 1):S181-S191, 2003
Bittencourt, S. A. Uma alternativa para a política nutricional brasileira? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, n. 3, Rio de Janeiro, Jul/Set, 1998.

Boaventura, G. T., Chiappini, C. C. D. J., Fernandes, N. R. A., *et al.* Avaliação da Qualidade Protéica de uma Dieta Estabelecida em Quissamã, Rio de Janeiro, Adicionada ou Não de Multimistura e de Pó de Folha de Mandioca. **Revista de Nutrição**, v.13, n.3, p.201-209. 2000.

Colla, L. M., Muccillo-Baisch, A. L., Costa, J. A. V. **Braz. arch. biol. technol.** v.51 n.2: pp.405-411, Mar./Apr. 2008.

Ferreira, H. D. S., Assunção, M. L. D., França, A. O. S. D., *et al.* Efetividade da "multimistura" como Suplemento de Dietas Deficientes em Vitaminas e/ou Minerais na Recuperação Ponderal de Ratos Submetidos à Desnutrição Pós-natal. **Revista de Nutrição**, v.18, n.1, p.63-74. 2005.

Gigante, D. P., Buchweitz, M., Helbig, E., *et al.* Randomized clinical trial of the impact of a nutritional supplement "multimixture" on the nutritional status of children enrolled at preschools. **J Pediatr (Rio J)**, v.83, n.4, Jul-Aug, p.363-9. 2007.

Glória, E.C.S.; Almeida, N.A.V.; Costa, A.S.V.; Júnior, E.H.; Martins, S.L.; Paula, H.; Silva, M.E.; Santos, R.C.; Malaquias, L.C.C. Avaliação protéica de uma nova multimistura com base no milho QPM BR 473. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 379-385, 2004.

Harkness, J., Wagner, J. E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. Rocca, 3ª ed. São Paulo, 1993.

Henrikson, R. Microalga *Spirulina*. **Superalimento del Futuro**. Ediciones Urano S.A. Barcelona, Spain, 1994.

Hernández, T.; Hernández, A.; Martinez, C. Calidad de Proteínas. Conceptos y Evaluación. **Alimentaria**, v. 27, p. 27-37, jul-ago, 1996.

Jood, S.; Kapoor, A. C.; Singh, R. Biological evaluation of protein quality of maize as affected by insect infestation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 40, p. 2439-2442, 1992.

Kahlon, T. S., Chow, F. I. Lipidemic response of hamsters to Rice bran, uncooked or processed White and Brown Rice and processed corn starch. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 673-678, 2000.

Kaneko J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 4thed. Academic Press, San Diego, California. 1989. 932p.

Leite, M. S.; Azeredo, V. B. de.; Carmo, M. Das G. T. do.; Boaventura, G. T. Utilização da multimistura durante a lactação e seus efeitos na produção e composição do leite materno de ratas. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 211-221, mai/ago., 2002.

Madruga, M. S.; Câmara, F. S. The chemical composition of "Multimistura" as a food supplement. **Food Chemistry**, v. 68, p. 41-44, 2000.

Madruga, M. S., Santos, H. B., Bion, F. M., *et al.* Avaliação Nutricional de uma Dieta Suplementada com Multimistura: Estudo em Ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.129-133. 2004.

Miller, D.; Bender, A. E. The determination of the net protein utilization of proteins by a shortened method. **British Journal of Nutrition**, London, v. 9, p. 382-388, 1955.

Monteiro, C. A., Szarfarc, S. C. e Mondini, L. Secular trends in childhood in the city of Sao Paulo, Brazil (1984-1996). **Rev Saude Publica**, v.34, n.6 Suppl, Dec, p.62-72. 2000.

Monteiro, J. B. R., Costa, N. M. B., Esteves, E. A.; Milagres, K. H. Avaliação da qualidade protéica de dois formulados em pó, à base de soja enriquecidos com zinco, selênio e magnésio para utilização em nutrição enteral. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 006-010, jan.-mar., 2004.

Reeves, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr**, v.127, n.5 Suppl, May, p.838S-841S. 1997.

Reeves, P. G., Nielsen, F. H. e Fahey, G. C., Jr. 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. **J Nutr**, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Sanchis, F. S. e Silbiger, H. L. N. Animais de Laboratório. **Purina Alimentos**, p.12-14. 1986.

Santos, H. B., Madruga, M. S., Bion, F. M., *et al.* Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.613-618. 2004.

Sgarbieri, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação**. São Paulo, Ed. Varela, 1996. 517 p.

Souza, J. C. D., Mauro, A. K., Carvalho, H. A. D., *et al.* Qualidade Protéica de Multimisturas Distribuídas em Alfenas, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Nutrição**, v.19, n.6, p.685-692. 2006.

Vijayalakshmi, T., Muthulakshmi, V. e Sachdanandam, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **J Ethnopharmacol**, v.69, n.1, Jan, p.9-15. 2000.

Vonshak, A. **Spirulina platensis (Arthtopira). Physiology, Cell Biology and Biotechnology**. Taylor e Francis, London, 1997. 233 pp.

ANEXOS

APÊNDICE I – MISTURAS MINERAL E VITAMÍNICA

Mistura de minerais para adição à dieta padrão segundo AIN-93 Growth.

Minerais	AIN-93G-MX (g ou mg/Kg de mistura)
Carbonato de cálcio anidro (40,04% Ca)	357,00
Fosfato de potássio monobásico (22.76% P, 28.73% K)	196,00
Citrato de potássio, monoidrato tripotássico (36.16% K)	70,78
Cloreto de sódio (39.34% Na, 60.66% Cl)	74,00
Sulfato de potássio (44.87% K, 18.39% S)	46,60
Óxido de magnésio (60.32% Mg)	24,00
Citrato de ferro (16.5% Fe)	6,06
Carbonato de zinco (52.14% Zn)	1,65
Sódio-meta-silicato - 9H ₂ O (9.88% Si)	1,45
Carbonato de manganês (47.79% Mn)	0,63
Carbonato cúprico (57.47% Cu)	0,30
Sulfato-potássico-crômico - 12H ₂ O (10.42% Cr)	0,275
Ácido bórico (17.5% B), <i>mg</i>	81,5
Fluoreto de sódio (45.24% F), <i>mg</i>	63,5
Carbonato de níquel (45% Ni), <i>mg</i>	31,8
Cloreto de lítio (16.38% Li), <i>mg</i>	17,4
Selenato de sódio anidro (41.79% Se), <i>mg</i>	10,25
Iodeto de potássio (59.3% I), <i>mg</i>	10,0
Paramolibdato de amônio - 4H ₂ O (54.34% Mo), <i>mg</i>	7,95
Vanadato de amônio (43.55% V), <i>mg</i>	6,6
Sacarose em pó	221,026

* Reeves *et al.* (1993a).

Mistura vitamínica recomendada para utilização com as formulações das dietas AIN-93G e AIN-93M.*

Vitamina	Quantidade (g/Kg de mistura)
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina (B ₆)-HCl	0,700
Tiamina (B ₁)-HCl	0,600
Riboflavina (B ₂)	0,600
Ácido fólico	0,200
Biotina	0,020
Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina) (0,1% em manitol)	2,500
Vitamina E (acetato de α -tocoferol)** (500IU/g)	15,000
Vitamina A (palmitato retinil trans)** (500,000 IU/g)	0,800
Vitamina D ₃ (colecalfiferol) (400,000 IU/g)	0,250
Vitamina K ₁ (filoquinona)	0,075
Sacarose em pó	974,655

* Reeves *et al.* (1993a).

** A forma de matriz gelatinosa destas vitaminas é recomendada.

**APÊNDICE 2 – VERSÃO DO ARTIGO 1 SUBMETIDO AO PERIÓDICO
“INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY”**

**IRON BIOAVAILABILITY AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RATS FED WITH A
MULTIMIX ADDED IN SPIRULINA PLATENSIS**

Running title: Iron bioavailability in Multimixes with Spirulina

Authors:

Paula Lobo Marco¹

Leonor Almeida de Souza Soares

Eliana Badiale Furlong

Institution: Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil

Abstract

Iron deficiency anemia is the most prevalent nutritional need worldwide and among its causes, inadequate eating habits prevail. Multimix addition in diet has been studied as a potential nutrient source. The microalgae *Spirulina platensis* contains iron and has proved to be a good hemoglobin restorer in rats. This study evaluated iron bioavailability in multimixes added in with *Spirulina* by a biological assessment with 24 female *Wistar* rats. After administration of a diet lacking iron, the rats were fed 3 different multimixes and a control diet: Multimix with rice bran + 2% of *Spirulina*; Multimix with wheat bran + 2% of *Spirulina*; Multimix adopted by the Child's Pastoral; Casein-based control diet. Rice bran was more efficient than wheat bran over animal weight gain. *Spirulina* seems to be better regarding weight gain compared to diets without the algae. Multimixes, compared to control diet, presented satisfactory results regarding development and hematologic parameters.

INTRODUCTION

Iron deficiency anemia is the most prevalent nutritional need worldwide and affects developing and developed countries (WHO 2001). Children and women of fertile age, including pregnant women, are the population groups more at risk of developing such deficiency (Neuman et al. 2000). In Brazil, 35% of children between the ages of 1 and 4 are estimated to be anemic, representing nearly 5 million anemic children solely in this age group (Mora and Mora 1997).

There are no reliable data to indicate precisely the extent of the disease in Brazil. However, some studies carried out in São Paulo State have shown that, although the decrease in infant mortality and malnutrition, anemia cases are still on the rise (Monteiro et al. 2000). Nutritional transition that Brazil is undergoing presents a unique feature: two opposite (by definition) situations are aggravating – a nutritional need (anemia) and typical food excess conditions, such as overweight and obesity (Batista Filho et al. 2008).

One of the main causes leading to the high prevalence of anemia, especially among children, are the inadequate eating habits, early cow's milk and iron-poor solid food consumption, frequent and excessive tea consumption and low intake of meat and vitamin C. Breastfeeding for more than six months with no iron supplementation and low bioavailability of the mineral in the food included in the diet also are responsible for the infant's anemic condition (Lozoff et al. 2000).

Alternative food based on bran and cereals, known as "multimix" has been used as a strategy by philanthropic institutions as the "Pastoral da Criança" (Child's Pastoral) to fight nutritional deficiencies. In theory, it would improve the nutritional value of the diet by using low-cost ingredients that are rich in micronutrients (Gigante et al. 2007).

Multimix recipes vary according to local availability of the ingredients, usually employing unusual foods, mostly industry by-products as wheat and rice bran, egg shells, dark-green vegetables and seeds.

Spirulina platensis is a microalgae that contains a significant amount of iron and its ability to promote hemoglobin production has been verified in anemic rats. The algae has a blend of hematopoietic nutrients, containing 46 to 70% of protein and is a good source of folic acid, vitamins B12, E, copper and beta-carotene (Kapoor and Mehta 1993).

Research of non-usual, low-cost and achievable iron sources is an important strategy to fight anemia in developing countries. The aim of this study is to evaluate

multimixes combined with *Spirulina* as dietary iron sources. For this purpose, *Spirulina* was added to different cereal multimixes to improve iron content, and, therefore, evaluate its *in vivo* availability using as biological model *Wistar* rats.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

Animals: 24 female rats (*Rattus norvegicus*, breed *Wistar/UFPel*), weaned at 21 days, weighing between 85 and 138g were used in the experiment. The animals were supplied by the Central Vivarium of the Federal University of Pelotas (UFPel).

Raw Material: To prepare the multimixes the following ingredients were used as raw material: wheat bran, corn flour, sunflower seed, cassava leaf powder, egg shells and the microalga *Spirulina platensis*.

Wheat bran, corn flour, sunflower seed and cassava leaf powder were obtained commercially. Rice bran was supplied by a nearby industry, egg shells were donated by Rio Grande's bakeries and the dehydrated microalgae (spaghetti-shaped) was supplied by the Biochemical Engineering Laboratory of the Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

To prepare the control and iron-depletion diets, different ingredients were used to fulfill nutritional needs of the animals, such as casein, sucrose, maltodextrin, corn starch, soy oil, mineral and vitamins compounds, and the amino acids L-cistine and choline chloridrate.

METHODS

Raw Material Preparation: Multimixes (MM) were prepared at the FURG's Biochemistry Laboratory and, hygiene and conservation rules for each ingredient were followed to reduce contamination risk.

The procedure employed in the preparation of raw materials followed the techniques employed by Feddern (Feddern 2007). Corn bran and flour were oven-toasted at 130°C with air circulation during 30 minutes. Egg shells were washed (running water), boiled with acetic acid (4%) during 30 minutes oven-dried at 130°C with air circulation during 1h 30 minutes and grinded in a knife mill at 18800 G during 1 minute. *Spirulina platensis* and sunflower seeds were grinded in a knife mill at 18800 G

during 3 minutes. Cassava leaves were not pre-treated, as it was already acquired as powder. Later, all materials were sifted and two samples were obtained according to granulometry. The multimixes were prepared using ingredients with a granulometry of 0.56 mm or less (Tyler 32).

Diets preparation: Three different multimix diets were prepared and a fourth control diet (casein). Child's Pastoral Diet (CPD) contained 65% of wheat bran, 20% corn flour, 5% cassava leaf powder, 5% egg shells (powder) and 5% sunflower seeds (powder). The diets Rice Bran Multimix + Spirulina (RBS) and Wheat Bran Multimix + Spirulina (WBS) were the same, except for the bran, both contained 68% Rice/Wheat bran, 20% corn flour, 5% cassava leaf powder, 5% egg shells (powder) and 2% of *Spirulina platensis* (powder). Control Diet (CD) was prepared as suggested by the AIN (American Institute of Nutrition) (Reeves 1997, Reeves et al. 1993).

After the ingredients mixing, the diets were moistened with starch gel (8%), to allow manual pelletization, then a 20-h drying process was carried out in a stove (45°C) with air circulation.

Diets were prepared on a weekly basis at the UFPEL's Food Processing Laboratory and animals were fed daily.

Biological Assay: the assay was carried out at the UFPEL's Nutrition Faculty, in the animal experimentation room and followed the rules of the COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation) and the Ethics Committee of the University.

First, all animals (n=24) went through a 60-day pre-experimental period when they were fed a low-iron diet (LFe) aiming to decrease red blood cell counting. This diet was prepared similar to the control diet, except for the iron supplement (ferric chloride) that was not included.

After depletion, blood was sampled to micro-hematocrit analysis; rats were weighed and randomly allocated in four groups (6 animals each) according to the diet: 1) Rice Bran Multimix + 2% *Spirulina* (RBS); 2) Wheat Bran Multimix + 2% *Spirulina* (WBS); 3) Child's Pastoral Multimix (CPD); 4) Casein/Control Diet (CD).

During experimentation, each animal was kept in an individual stainless steel Cage, and each group was fed with the diets (15g/day) for 21 days, water *ad libitum*, as recommended for adult rats (Sanchis and Silbiger 1986). Temperature was kept in the range of 21-25°C, relative humidity 55-60% and automatic light cycle of 12 hours.

Hematology: for hematocrit measurement, blood was collected from the caudal vein using heparin-prepared micro-capillary tubes. Hemoglobin was measured weekly

using a portable photometer (HemoCue®), with one drop of blood in disposable microcuvettes.

By the end of the experiment, after submitted to a 12h-fasting period, animals were sedated in a chamber with ethylic ether and blood was collected by heart puncture. One drop of blood was used to assess glycemic levels (Accu-Check Advantage II) the remainder was preserved in two types of *eppendorf* tubes, one with anticoagulant EDTA to determine hematologic indices, and the other, without anticoagulant, to obtain serum for biochemical analysis. Plasma and serum (with and without EDTA, respectively) were separated after centrifugation of 3mL of blood during 8 minutes, at 3500 rpm and conserved at -18°C. Hematimetric indices and total blood parameters (hemogram) were determined with the Micros 60 equipment from ABX. Other parameters were determined with Labtest® kits using LabMax 240.

Diet Iron Content Determination

Total iron was determined by the colorimetric method using phenanthroline/hydroxylamine (AACC 1995, Silva and Paschoal 2003), absorbance measurements were done with a UV-Visible spectrophotometer (Varian® Cary 100 conc), 510 nm wavelength. Calculations were based on a standard curve with a concentration range between 0 and 3 µg.L⁻¹.

Statistical Analysis

The results are expressed as mean ± standard deviation (SD). Differences between groups were verified through Analysis of Variance (ANOVA), mean values were compared by Tukey test, significance level set to 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental diets presented the following iron content: RBS (4.7 mg/100 g); WBS (5.2 mg/100 g); CPD (4 mg/100 g) and CD (8 mg /100g); similar content reported previously by Barbosa *et al.*, 2006 (6.2 mg/100 g); Vizeu *et al.*, 2005 (between 3.8 and 13.7 mg/100 g) and Santos *et al.*, 2004 (7.6 mg/100 g) for multimixes, considering the different composition of each formulation and the different analytical methods employed (Barbosa et al. 2006, Santos et al. 2004, Vizeu et al. 2005).

Even after 60 days under an iron-depletion diet (iron content: 0,4 mg/100 g), the animals still did not present anemia, hematocrit and hemoglobin levels were still within normal range for the species (Ringler and Dabich 1979, Sanchis and Silbiger 1986). This could have happened probably because of the short period, insufficient to reduce

significantly blood minerals in the animals, since iron deficiency anemia is a chronic disease, and clinical presentation of mineral deficiency might take longer. In a study by Toaiari et al. 2005 (Toaiari et al. 2005), iron depletion began in pregnancy of the animals, by a low-iron diet and was maintained until after weaning.

Table 1 presents hemogram values of the animals according to diet.

Table 1. Mean hemogram values of the animals according to diet.

	RBS*	WBS*	CPD*	CD*	p
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
Erythrocytes 10 ⁶ /mm ³	5.3 ± 0.2 ^a	5.1 ± 0.6 ^a	5.2 ± 0.4 ^a	5.0 ± 0.3 ^a	0.77
Hemoglobin g/dL	13.4 ± 1.0 ^{ab}	11.6 ± 1.9 ^a	14.5 ± 0.6 ^b	13.9 ± 2.2 ^{ab}	0.03
Hematocrit %	30.8 ± 1.7 ^a	30.1 ± 4.1 ^a	30.1 ± 1.8 ^a	30.1 ± 1.4 ^a	0.95
MCV fL	58.2 ± 1.3 ^a	59.3 ± 1.0 ^a	58.3 ± 1.0 ^a	60.0 ± 1.7 ^a	0.20
MCH pg	22.7 ± 1.0 ^a	23.0 ± 2.0 ^a	23.4 ± 1.5 ^a	24.8 ± 2.7 ^a	0.47
MCHC g/dL	38.9 ± 1.7 ^a	39.1 ± 4.1 ^a	40.2 ± 2.0 ^a	41.1 ± 3.6 ^a	0.71
RDW %	13.8 ± 0.5 ^{ab}	12.7 ± 0.2 ^a	12.8 ± 0.8 ^a	14.4 ± 0.9 ^b	0.01

*WBS: wheat bran multimix and *Spirulina*; RBS: Rice bran multimix and *Spirulina*; CPD: Child's Pastoral multimix; CD: control diet (casein). SD: standard deviation. Different letters on the same row indicate statistical difference by Tukey test ($p < 0.05$).

All values observed in the hemograms are within normal range for rats (Sanchis and Silbiger 1986). Besides, we observed that only hemoglobin values and RDW (red blood *cell* distribution width) were significantly different (Tukey test, significance level 5%). MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) and MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) were very similar for all groups.

Iron deficiency anemia is usually accompanied by an increase in the RDW, indicating heterogeneity in erythrocytes width. RDW must always be assessed at the same time as MCV (mean corpuscular volume), to avoid misinterpretation of data when considered apart (Paiva et al. 2000). These indices must be evaluated with other anemia parameters (hematocrit, hemoglobin and erythrocytes) to search for any alteration in one of the parameters. Although the control group presented a higher value compared to WBS and CPD groups, all parameters are within normal ranges for the species (Sanchis and Silbiger 1986). MCV values were similar in all groups (no statistical difference).

Hemoglobin mean value for the group fed with Child's Pastoral multimix (CPD) was significantly higher than for the Wheat/*Spirulina* group (WBS). The two diets are different only with respect to sunflower seed in the CPD and *Spirulina* in the WBS. Other groups were no different regarding hemoglobin values.

When considering the hemoglobin values individually (data not shown), it is noticeable that the lower value observed in WBS group is due to a single animal that presented a much lower value compared to the rest of the group, lowering the mean value. In biological assays the individual difference of each organism must be considered, as the animal's metabolism can interfere significantly when the outcome evaluated is the mean value.

Kapoor & Mehta (1993) have tested *Spirulina* at higher concentrations than this study (24%) associated with other vegetal products and found an increased hemoglobin value in rats during pregnancy and lactation (Kapoor and Mehta 1993). This finding suggests that a 2% algae concentration may not be enough to increase iron content.

The results from our study for the hemoglobin in control group (diet prepared according to AIN 93) were higher than those found by Toiari, 2005 (Toiari et al. 2005) using the same diet – 13.9 ± 2.2 g/dL and 11.9 ± 0.9 g/dL, respectively.

According to Ringler e Dabich, 1979 (Ringler and Dabich 1979) the range of 11.4 g/dl a 19.2 g/dl in rats hemoglobin concentration, depends on age, sex, breed and health status of the animal.

Table 2 presents serum mineral results in the studied rats.

Table 2. Mean values of serum minerals in experimental groups, according to diet.

	RBS*	WBS*	CPD*	CD*	p
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Serum Minerals					
Iron μ g/dL	455.8 \pm 30.3 ^a	506.5 \pm 159.9 ^a	493.7 \pm 180.2 ^a	399.8 \pm 88.3 ^a	0.50
Calcium mg/dL	10.3 \pm 0.4 ^a	10.2 \pm 1.8 ^a	10.8 \pm 0.6 ^a	10.6 \pm 0.4 ^a	0.71
Magnesium mg/dL	2.5 \pm 0.3 ^a	2.6 \pm 0.6 ^a	2.5 \pm 0.3 ^a	2.6 \pm 0.2 ^a	0.10
Phosforus mg/dL	8.1 \pm 2.8 ^a	8.2 \pm 2.4 ^a	7.2 \pm 1.6 ^a	7.4 \pm 2.2 ^a	0.84
Sodium mEq/L	128.4 \pm 7.2 ^a	127.3 \pm 21.4 ^a	126.5 \pm 10.8 ^a	131.7 \pm 6.7 ^a	0.90
Potassium mEq/L	6.9 \pm 3.4 ^a	6.7 \pm 3.2 ^a	6.6 \pm 2.8 ^a	7.0 \pm 3.7 ^a	0.10
Chlorine mEq/L	90.0 \pm 4.2 ^a	88.5 \pm 15.2 ^a	87.0 \pm 8.2 ^a	92.2 \pm 6.5 ^a	0.80

***WBS:** wheat bran multimix and *Spirulina*; **RBS:** Rice bran multimix and *Spirulina*; **CPD:** Child's Pastoral multimix; **CD:** control diet (casein). **SD:** standard deviation. Different letters on the same row indicate statistical difference by Tukey test ($p < 0.05$).

Similar to the studies by Santos and Madruga (2004) and Bion and Pessoa (1997), in the present study the multimix added to the diet did not change iron serum values or the hematocrit of the animals (Bion et al. 1997, Santos et al. 2004). Other serum minerals evaluated were also within normal range and did not change according to diet group (Table 2). Siqueira et al. evaluated calcium, iron and zinc bioavailability in rats fed with multimixes and observed good results, showing that fitates did not impair nutrients absorption (Siqueira et al. 2001).

Although hemoglobin is a worldwide used parameter to establish anemia, it is known that it presents low specificity and sensibility to evaluate iron nutritional status (Alferez et al. 2006). Thus, the complete hemogram analysis of the rats fed with different diets, to measure RDW and MCV (mean corpuscular volume) values allows a more accurate result in the biological assay.

Boaventura *et al.* (2003) studied the effects of supplementing the usual diet in Quissamã (Rio de Janeiro, Brazil) and a standard diet on weight, hemoglobin and rats hematocrit. Two types of supplement were added in the diets: vitamins + minerals (VM) and multimix (MM) with modified composition. Higher values of hemoglobin were found in animals fed with standard diet supplemented with MM, and other supplements did not change blood parameters compared to the usual diet. The hematocrit was different (lower) only in the group fed with standard diet + VM. As for weight gain, standard diet group with MM presented the lowest gain (statistically significant compared to other groups).

CONCLUSION

Based on the results, there is evidence that multimix use is a viable strategy to prevent iron deficiency anemia and to be a mineral dietary source, since the findings point out that biological responses among rats, when used as exclusively and not only as a complement, are very similar to those obtained when a standard diet is used.

The addition of Spirulina in an amount of 2% showed no difference on animals' biochemical indices. As previously observed, a higher concentration of the alga probably would result in significant improvements on blood parameters.

Overall, in spite of controversy regarding alternative foods, when adequately prepared, multimixes recipes can improve nutrient content in the diet of those in need. To confirm it, our study showed that multimix diets performed well compared to a standard diet with regard to hematology and development measurements. Certainly there must be prudence when extrapolating these results obtained among animals to

humans, because of metabolism differences between species, highlighting the need for similar efficiency studies to be carried out among humans.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Marlos R Domingues, PhD for assisting in the translation of the original manuscript into English.

REFERENCES

- HemoCue: Blood Hemoglobin Photometer. Operating Manual. Angelholm, Sweden.
- AACC, A. A. O. C. C. (1995). *Approved Methods of the AACC. Iron-Spectrophotometric Method (40-41b)*. St. Paul, MN, 9th ed.
- ALFEREZ, M. J. M., LOPEZ-ALIAGA, I., NESTARES, T., DIAZ-CASTRO, J., BARRIONUEVO, M., ROS, P. B. & CAMPOS, M. S. (2006). Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropenic anaemia in comparison with cow milk. *International Dairy Journal*, 16, 813-821.
- BARBOSA, C. D. O., LOPES, I. B. D. M., MORGANO, M. A., ARAÚJO, M. A. D. M. & MOREIRA-ARAÚJO, R. S. D. R. (2006). Conteúdo de Minerais dos Ingredientes da Multimistura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 916-920.
- BATISTA FILHO, M., DE SOUZA, A. I., MIGLIOLI, T. C. & DOS SANTOS, M. C. (2008). [Anemia and obesity: a paradox of the nutritional transition in Brazil]. *Cad Saude Publica*, 24 Suppl 2, S247-57.
- BION, F. M., PESSOA, D. C., LAPA, M. A., CAMPOS FDE, A., ANTUNES, N. L. & LOPES, S. M. (1997). [The use of a multimix as a dietary supplement: study in rats]. *Arch Latinoam Nutr*, 47, 242-7.
- FEDDERN, V. (2007). Influência da Composição e da Fermentação na Biodisponibilização de Nutrientes em Multimisturas. In: *Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos*. Pp. 110. Rio Grande: Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

- GIGANTE, D. P., BUCHWEITZ, M., HELBIG, E., ALMEIDA, A. S., ARAUJO, C. L., NEUMANN, N. A. & VICTORA, C. (2007). Randomized clinical trial of the impact of a nutritional supplement "multimixture" on the nutritional status of children enrolled at preschools. *J Pediatr (Rio J)*, 83, 363-9.
- KAPOOR, R. & MEHTA, U. (1993). Effect of supplementation of blue green alga (Spirulina) on outcome of pregnancy in rats. *Plant Foods Hum Nutr*, 43, 29-35.
- LOZOFF, B., JIMENEZ, E., HAGEN, J., MOLLEN, E. & WOLF, A. W. (2000). Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics*, 105, E51.
- MONTEIRO, C. A., SZARFARC, S. C. & MONDINI, L. (2000). [Secular trends in childhood in the city of Sao Paulo, Brazil (1984-1996)]. *Rev Saude Publica*, 34, 62-72.
- MORA, J. O. & MORA, L. M. (1997). Deficiencias de micronutrientes en América Latina Y el Caribe: anemia ferropriva. . (edited by SALUD, O. P. D. L.). Organización Panamericana de La Salud. Washington (DC):.
- NEUMAN, N. A., TANAKA, O. Y., SZARFARC, S. C., GUIMARAES, P. R. & VICTORA, C. G. (2000). [Prevalence and risk factors for anemia in Southern Brazil]. *Rev Saude Publica*, 34, 56-63.
- PAIVA, A. A., RONDÓ, P. & GUERRA-SHINOHARA, E. M. (2000). Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. *Rev Saude Publica*, 34, 421-6.
- REEVES, P. G. (1997). Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*, 127, 838S-841S.
- REEVES, P. G., NIELSEN, F. H. & FAHEY, G. C., JR. (1993). 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. *J Nutr*, 123, 1939-51.
- RINGLER, D. & DABICH, L. (1979). Hematology and Clinical Biochemistry. In: *The Laboratory Rat*. San Diego, Academic Press.

- SANCHIS, F. S. & SILBIGER, H. L. N. (1986). Animais de Laboratório. Purina Alimentos, 12-14.
- SANTOS, H. B., MADRUGA, M. S., BION, F. M., ANTUNES, N. L. M., MENDES, K. & ÁGUIDA, R. (2004). Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24, 613-618.
- SILVA, C. A. & PASCHOAL, L. R. (2003). Análise simultânea dos teores de Fe²⁺ e Fe³⁺ em formulações de sulfato ferroso. *Revista interação*, 7.
- SIQUEIRA, E. M., ARRUDA, S. F., DE SOUSA, L. M. & DE SOUZA, E. M. (2001). Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats. *Arch Latinoam Nutr*, 51, 250-7.
- TOAIARI, S. D. A., YUYAMA, L. K. O., AGUIAR, J. P. L. & SOUZA, R. F. S. (2005). Iron bioavailability of the açai(*Euterpe oleracea* Mart.) and the iron-fortified manioc flour in rats. *Rev. Nutr.*, 18, 291-299.
- VIZEU, V. E., FEIJÓ, M. B. S. & CAMPOS, R. C. D. (2005). Determinação da Composição Mineral de Diferentes Formulações de Multimistura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 254-258.
- WHO (2001). Iron deficiency anemia: assessment, prevention, and control: a guide for program managers. (edited by ORGANIZATION, W. H.). WHO, Geneva.

– CAPÍTULO IV –

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ANDRADE, A.S.; CARDONHA, A.M.S. Análise microbiológica da multimistura. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 16., 1998. Rio de Janeiro. **Anais... Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 1998. CD-ROM.

ANDREWS, P.A. Disorders of iron metabolism. **The New England Journal of Medicine**, v.341, n.26, 1999.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 17th edition, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Biotechnologia industrial – Biotechnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 523 p.

AZEREDO, V.B. de.; DIAS, M.M.; BOAVENTURA, G.T. ; CARMO, M. das G.T. do; FERNANDES, N.R. Influência da multimistura na gestação de ratas: pesos materno e fetal e triglicerídeos séricos. **Rev. Nutr., Campinas**, 16(1):83-91, jan./mar., 2003.

AZEREDO, V.B.; BOAVENTURA, G.T.; CARMO, M.G.T. do. Determinação da concentração de tanino em duas multimisturas. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 16., 1998, Rio de Janeiro. **Anais... Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 1998. CD-ROM.

BATISTA FILHO M.; RISSIN A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 19, 2003.

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

BENDER, A. E.; DOELL, B. H. Biological evaluation of proteins: a new aspect. **British Journal of Nutrition**, n. 11, p. 140-148, 1957.

BENITO, P.; MILLER, D.M. Iron absorption and bioavailability: an update review. **Nutrition Research**, v.18, n.3, p.581-603, 1998.

BIANCHI, M.L.P.; SILVA, H.C.; OLIVEIRA, J.E.D. Considerações sobre a biodisponibilidade de ferro dos alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 42, n.2, p.94-100, 1992.

BITTENCOURT S.A. Uma alternativa para a política nutricional brasileira? **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 14(3):629-636, jul-set, 1998.

BOAVENTURA, G. T.; CHIAPPINI, C. C. de J.; ASSIS FERNANDES, N. R.; OLIVEIRA, E. M. de. Avaliação da qualidade protéica de uma dieta estabelecida em Quissamã, Rio de Janeiro, adicionada ou não de multimistura e de pó de folha de mandioca. **Rev. Nutr.**, v.13, n.3, Campinas set./dez., 2000.

BOAVENTURA, G. T.; SILVA, R. H. de L.; TOSTES, L. F.; AZEREDO, V. B. de. Ganho de peso, hemoglobina e hematócrito de ratos recebendo dieta de Quissamã, RJ, com

ou sem suplemento alimentar alternativo. **Rev. Nutr., Campinas**, 16(3): 321-331, jul./set., 2003.

BRANDÃO, C.T.; BRANDÃO, R.F. **Alternativas Alimentares**. Londrina: Centro de Pastoral Popular. 1988. 48p.

BRANDÃO, C.T.; BRANDÃO, R.F. **Alimentação Alternativa**. Centro de Pastoral Popular, ed. Redentorista, Brasília, DF, 1996.

BRASIL.– RDC nº 53 de 15 de Junho de 2000. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Mistura à Base de Farelo de Cereais. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução. Brasília, 2000. 4p.

BURNETTE, M. A.; RUSOLF, E. E. GMA. Test protein quality assays. **Food Technology**, n. 32, p. 66-67, 1978.

CÂMARA, F.S.; MADRUGA, M.S. Cyanic Acid, Phytic Acid, Total Tannin And Aflatoxin Contents of a Brazilian (Natal) Multimistura Preparation. **Rev. Nutr.** v.14 n.1, Campinas jan./abr, 2001.

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

CARRAZZA, F.R. Minerais em dietas latinoamericanas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.38, n.3, p.599-621, 1988.

CEZARE, E.A. **Contribuição ao estudo da produção de biomassa de *Spirulina platensis* empregando uréia como fonte de nitrogênio por meio de processo descontínuo alimentado**. São Paulo, 1998. Dissertação (Mestre em Tecnologia Bioquímico-farmacêutica). Universidade de São Paulo (USP).

CHAMORRO, C.G.; SALAZAR, M.; ARAÚJO, K.G.L.; SANTOS, C.P.; CEBALLOS, G.; CASTILLO, L.F. Actualización en la Farmacología de *Spirulina* (Arthrospira), un alimento no convencional. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, n.3. Caracas, set 2002.

CLYDESDALE, F.M.; Ho, C.T.; LEE, C.Y.; MONDY, N.I.; SHEWFELT, R.L. The effects of post harvest treatment and chemical interactions on the bioavailability ascorbic acid, thiamin, vitamin A, carotenoids and minerals. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.30, p.599-638, 1991.

COELHO, R.G. *Interações nutricionais/ parte 1: interações ao nível do trato gastrointestinal*. **Revista de Metabolismo e Nutrição**. Porto Alegre, v.2, n.3, p.106-117, 1995.

COOK, J.D. Determinants of nonheme iron in man. **Food Technology**, v.37, n.10, p.124-126, 1983.

COLLA, L.M. **Influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial de redução da hipercolesterolemia**. Rio Grande, 2002, 128p. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

CONTRERAS, A.; HERBERT D.C.; GRUBBS, B.G.; CAMERON, I.L. Blue-Green Alga *Spirulina* as the Sole Dietary Source of Protein in Sexually Maturing Rats. **Nutr. Rep. Int.**, 19: 749-763, 1979.

CORRÊA, A.D.; WOBETO, C.; ABREU, J.R. de; ABREU, C.M.P. de; SANTOS, C.D. dos. Avaliação de antinutrientes da farinha de folhas de seis cultivares de mandioca. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos-CBCTA, Porto Alegre. **Anais...: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, CD-ROM, p. 1140-1143, 2002.

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

DOMENE M.S.A. **Estudo do valor nutritivo do farelo de arroz. Utilização do zinco, ferro, cobre e cálcio pelo rato em crescimento**. Campinas, 1996. 104p. Tese (Doutor em Ciências da Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

DUTRA, C.B.; CALLEGARO, M.G.K.; HUBER, L.S.; BECKER, L.V.; ROSA, C.S. da; HECKTHEUER, L.H.; KUBOTA, E.H. Determinação de Fibra Alimentar Insolúvel, Solúvel e Total em Produtos Derivados do Milho. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 18., 2002, Porto Alegre. **Anais... Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2002. CD-ROM

ELPO, E.R.S.; FREITAS, R.J.S. de; GOMES, E.C. Avaliação dos teores de ferro nos alimentos da cesta básica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.48, n.1, p.65-67, 1998.

JACQUES, F. **Nutritional aspects of *Spirulina***. Antenna Technologies. 1996. Geneva, Switzerland. Disponível em: http://www.antenna.ch/en/documents/AspectNut_UK.pdf. Acesso em: junho de 2007.

FARFAN, J.A. Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, 14(1): 205-212, jan-mar, 1998.

FARIA, A.F.; VASCONCELLOS, D.G.V.; SACCHET, F.S. **Multimistura: Um Estudo de Propriedades Físico-Químicas, Biológicas e Disponibilização de Nutrientes**. Rio Grande, 2005, 71p. Projeto de Graduação (Engenharia de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

FEDDERN, V. **Influência da Composição e da Fermentação na Biodisponibilização de Nutrientes em Multimisturas**. Rio Grande, 2007. 110p. Dissertação de Mestrado (Engenharia e Ciência de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

FONSECA, A.D.; GOMES, V.L.O. Programa de recuperação do crescimento e desenvolvimento de crianças com idade entre zero e cinco anos, matriculadas no centro educacional Fraternidade. **Vitalle**, Rio Grande, n. 11; p. 93-98, 1999.

FURTUNATO, D.M.N. **Multimistura: sua relação químico-nutricional**. Salvador, BA, 2003. Tese de Doutorado (Programa de Pós-graduação em Química). Universidade Federal da Bahia (UFBA).

GERMANO, R.M.A. **Disponibilidade de ferro na presença do β -caroteno e o efeito dos interferentes em combinações de alimentos**. Piracicaba, 2002. 95p. Dissertação de mestrado (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz). Universidade de São Paulo (USP).

GIUGLIANI E.R.J., VICTORA C.G. Normas alimentares para crianças brasileiras menores de dois anos: bases científicas. Brasília: **Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde**, 1997.

GLÓRIA, E.C.S.; ALMEIDA, N.A.V.; COSTA, A.S.V.; JÚNIOR, E.H.; MARTINS, S.L.; PAULA, H.; SILVA, M.E.; SANTOS, R.C.; MALAQUIAS, L.C.C. Avaliação protéica de uma nova multimistura com base no milho QPM BR 473. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 379-385, 2004.

GRANTHAM-McGREGOR, S; ANI, A. Reviews of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. **Journal of Nutrition**, v.131, n.2S/II, 649S-668S, 2001.

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

GUZMÁN-SILVA, M. A.; WANDERLEY, A. R.; MACÊDO, V. M.; BOAVENTURA, G. T. Recuperação da desnutrição em ratos mediante rações adicionadas ou não de suplemento alimentar e de vitaminas e minerais durante o período de crescimento. **Rev. Nutr.**, v. 17, n.1, Campinas, jan./mar. 2004.

HACKLER, L. R. An Overview of the AACCC/ASTM Collaborative Study on Protein Quality Evaluation. **Journal of Food Technology**, n. 32, p. 62-64, 1978.

HACKLER L.R. Rat bioassay methods for assessing protein quality of meat and poultry products. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 40, p. 711-717, 1984.

HEATH, A.L.M.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Clinical implications of changes in the modern diet: iron intake, absorption and status. **Best Practice & Research Clinical Hematology**, v.15, n.2, p.225-241, 2002.

HENRIKSON, R. Microalga *Spirulina*. **Superalimento del Futuro**. Ediciones Urano S.A. Barcelona, Spain, 1994.

HERNÁNDEZ, T.; HERNÁNDEZ, A.; MARTINEZ, C. Calidad de Proteínas. Conceptos y Evaluación. **Alimentaria**, v. 27, p. 27-37, jul-ago, 1996.

HOSENEY, R.C.; **Princípios de Ciencia y Tecnología de los Cereales**. Zaragoza, España, Ed. Acribia, 1991.

JAGNOW, G. e DAWID, W. **Biotechnología – introducción com experimentos modelo**. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1991. 251 p.

JASSBY, A. ***Spirulina: a model for microalgae as human food***. In: J. Lembi and S. Waland, Editors, *Algae and Human Affairs*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 1988.

JAY, J.M. **Microbiologia Moderna de los alimentos**. 3a ed., Editora Acribia, Zaragoza, Espanha 1994, 279p.

JOOD, S.; KAPOOR, A. C.; SINGH, R. Biological evaluation of protein quality of maize as affected by insect infestation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 40, p. 2439-2442, 1992.

KAPOOR, R.; MEHTA, U. Iron Status and Growth of Rats Fed Different Dietary Iron Sources. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.44 n.1: 29-34, 1993.

LATUNDE-DADA, G.O.; NEALE, R.J. Review: availability of iron from foods. **Journal of Food Technology**, v.21, p.255-268, 1986.

LEITE, M.S.; AZEREDO V.B.; CARMO M.G.T.; BOAVENTURA G.T. Use of multimixture during lactation and its effects on production and composition of rat milk. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, n. 2, 2002.

LEMOS, M.R.B. Estudo comparativo de três farelos de arroz. **Respostas biológicas e nutricionais, testadas em ratos Wistar**. Rio Grande, 1999. 112p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

LEMOS, M.R.B.; SOUZA-SOARES, L.A. de. Arroz e seus subprodutos na região sul do Brasil. **Vetor**, 10: 21-36, Rio Grande, 2000.

LOH, S.P.; OMAR, H.; ABDULLAH, A.S.; ISMAIL, M. Effects of Calcium Supplementation on Iron Bioavailability from *Spirulina*. **Nutrition & Food Science**, v.36 n.6: 429-437, 2006.

LOZOFF B.; JIMENEZ E., HAGEN J.; MOLLEN E.; WOLF A.W. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. **Pediatrics** 2000; 105:E51.

MADRUGA, M. S.; SANTOS, H. B.; BION, F. M. ANTUNES, N. L. M. Avaliação nutricional de uma dieta suplementada com multimistura: Estudo em ratos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(1): 129-133, jan.-mar, 2004.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9ª ed. São Paulo: Roca, 1998. 1179p.

MARTÍNEZ, C.; ROS, G.; PERIAGO M.J.; LÓPEZ, G. Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. **Archivos Latinamericanos de Nutrición**. V.49, n.2, p.106-113, 1999.

MARTINI, F.C.C. **Comparação entre a disponibilidade de ferro na presença de vitamina A e β -caroteno em alimentos e medicamentos**. Piracicaba, 2002. 113p. Dissertação de Mestrado (Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz). Universidade de São Paulo (USP).

MILLER, D.; BENDER, A. E. The determination of the net protein utilization of proteins by as shortened method. **British Journal of Nutrition**, London, v. 9, p. 382-388, 1955.

MODESTI, C.F. **Obtenção e caracterização de concentrado protéico de folhas de mandioca submetido a diferentes tratamentos**. Lavras, 2006, 90p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Agronomia). Universidade Federal de Lavras (UFLA).

MORA J.O., MORA L.M. Deficiencias de micronutrientes en América Latina Y el Caribe: anemia ferropriva. Washington (DC): **Organización Panamericana de La Salud**; 1997.

NEUMAN N.A., TANAKA O.Y., SZARFARC S.C., GUIMARÃES P.R.V., VICTORA C.G. Prevalência e fatores de risco para anemia no Sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 34 (1): 56-63, 2000.

OLIVEIRA S.M.S.; COSTA M.J.C.; RIVERA M.A.A.; SANTOS L.M.P.; RIBEIRO M.L.C.; SOARES G.S.F.; ASCIUTTI L.S.; COSTA S.F.G. Impacto da multimistura no estado nutricional de pré-escolares matriculados em creches. **Revista de Nutrição**, Campinas, 19(2):169-176, mar./abr. 2006.

OSÓRIO, M.M. Fatores determinantes da anemia em crianças. **Jornal de Pediatria**, v.78, n.4, p.269-278, 2002.

PELLET, P.I. Protein quality evaluation revised. **Food Technology**, n. 32, p. 60-79, 1978.

PUYFOULHOX, G.; ROUANET, J.M.; BESANCON, P.; BACCOU, J.C.; CAPORICCIO, B. Iron Availability from Iron-fortified *Spirulina* by an in vitro digestion/ Caco-2 cell culture model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49 n.3:1625-29, 2001.

REEVES, P.G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. **The Journal of Nutrition**, 127, nº5, 838S-841S, May 1997.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR, 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. **Rodents Diet**, 123(6):1939-1951, 1993.

SAMONDS, K.W.; HEGSTED, D.M. **Animal bioassays: a critical evaluation with specie reference to assessing nutritive value for the human**. In: BODWELL, C.E. Evaluation of protein for humans, Connecticut: Avi Publishing, p. 68-79, 1977.

SANT'ANNA, M.E.B.; MIRANDA, M.S.; CARDOSO, R.L.; CARVALHO, R. Diagnóstico da qualidade físico-química de mandioca (*Manihot esculenta crantz*) e da farinha em uma unidade produtora com processo de lavagem clorada da matéria-prima. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 18., 2002, Porto Alegre. **Anais... Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2002. CD-ROM.

SANT'ANA L.F.R.; CRUZ A.C.R.F.; FRANCESCHINI S.C.C.; COSTA N.M.B. Efeito de uma multimistura alimentar no estado nutricional relativo ao ferro em pré-escolares. **Revista de Nutrição**, Campinas, 19(4): 445-454, jul./ago. 2006.

SANTOS, A.S.; MACHADO, V.G.; BIERHALS, V.S.; ECHEVENGHÁ, W.O. **Estudo da Conservação e Efeito Bioativo de Multimisturas Enriquecidas com a Microalga *Spirulina platensis***. Rio Grande, 2007. 79 p. Projeto de Graduação (Engenharia de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

SANTOS I., CESAR J.A., MINTEN G., MARCO P.L., VALLE N. Efetividade do aconselhamento nutricional sobre a variação de hemoglobina. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 21(1):130-140, jan-fev, 2005.

SANTOS, H. B.; MADRUGA, M. S.; BION, F. M.; ANTUNES, N. L. M.; MENDES, K.; ÁGUIDA, R. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(4):613-618, out.-dez., 2004.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial – engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541 p.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação**. São Paulo, Ed. Varela, 1996. 517 p.

SIQUEIRA, E. M. A.; AZEVEDO, I. T.; ARRUDA, S. F.; LIMA, S. M. D.; GONÇALVES, C. A.; SOUZA, E. M. T. Regional low-cost diet supplement improves the nutritional status of school children in a semi-arid region of Brazil. **Nutrition Research**, 23:703–712, 2003.

SOARES, M.C.F.; TUERLINCKX, P.S.; ROSA, V.F. da; VELEDA, A.A.; QUADRADO, M.A. **Ocorrência de agravos de saúde em crianças, residentes na comunidade Santa Tereza (Rio Grande/RS) que utilizam a multimistura como suplemento alimentar**. 56º Congresso Brasileiro de Enfermagem; 2004; 1; 1; 92; 93; 56º Congresso Brasileiro de Enfermagem; Gramado/RS; BR; Português; 85-87582-23-2; Meio digital.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Disponível em:
http://www.sbp.com.br/show_item2.cfm?id_categoria=24&id_detalhe=1597&tipo_detalhe=s. Acesso em: setembro de 2006.

STOLTZFUS R.J. Defining iron-deficiency anemia in public health terms: a time for reflection. **J Nutr**, 2001; 131 (2 Suppl 2):565S-7S.

UNICEF. **Alimentação alternativa. Aspectos nutricionais e sociais. O papel das instituições**. Fortaleza, 1994, 14p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - Disponível em:
http://fnic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=4&tax_level=3&tax_subject=256&topic_id=1342&level3_id=5140&level4_id=0&level5_id=0&placement_default=0. Acesso em: setembro de 2006.

VELEDA, A. A. **Avaliação de um Programa de Suplementação Alimentar com Multimistura através do acompanhamento do crescimento de crianças residentes na comunidade de Santa Tereza no município do Rio Grande, RS**. Rio Grande, 2004. 81p Projeto de conclusão de curso (Enfermagem e Obstetrícia). Departamento de Enfermagem, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

VIROBEN, G.; BERTRAND, D. **La valeur nutritionnelle des matières protéiques végétales**. In: GODON, B. *Protéines végétales*. Paris: Vallery-Masson, 1985, p. 523-546.

VIZEU V.E.; FEIJÓ M.B.S.; CAMPOS R.C. Determinação da composição mineral de diferentes formulações de multimistura. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(2): 254-258, abr.-jun. 2005.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (Arthospira). Physiology, Cell Biology and Biotechnology**. Taylor e Francis, London, 1997. 233 pp.

WASLIEN, C.I. Unusual sources of protein for man. **Crit Rev Sci Nutr**, v.6, n.1, p.77-151, 1975.

WEBER, A.; KABKE, K.; COLLA, L.M.; FILHO, P.D. **Estudo da viabilidade Técnica da Utilização da Lagoa Mangueira para Produção de Microalgas de Valor Comercial**. Rio Grande, 2000. Projeto de graduação (Engenharia de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

WHO. **Iron deficiency anemia: assessment, prevention, and control: a guide for program managers**. In: Organization WH, ed.: WHO, Geneva 2001.

WIENER, H. K. Comida forte e barata. É a multimistura. Como tornar o alimento poderoso sem gastar um centavo a mais. **Vida Integral**, São Paulo. Disponível em: www.vidaintegral.com.br/nutricao/multimistura.php. Acesso em: setembro de 2006.

WIENK, K.J.H.; MARX; J.J.M.; BEYNEN, A.C. The concept of iron bioavailability and its assessment. **European Journal Nutrition**, v.38, p.51-75, 1999.

YOUNG, N.R.; JANGHORBANI, M. Soy proteins in human diet and relation to bioavailability of iron and zinc: a brief overview. **Cereal Chemistry**, v.58, n.1, p.12-18, 1981