

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Tatiane Takeda

PREPARAÇÃO DE PÃO FORTIFICADO PARA TRATAMENTO DA DEFICIÊNCIA DE FERRO E PREVENÇÃO DA ANEMIA FERROPRIVA EM CRIANÇAS COM IDADE PRÉ-ESCOLAR: CARACTERIZAÇÃO DO QUELATO PEPTÍDEO-FERRO, AVALIAÇÃO DO TEOR DE FERRO E ANÁLISE SENSORIAL.

Sorocaba/SP

2012

Tatiane Takeda

PREPARAÇÃO DE PÃO FORTIFICADO PARA TRATAMENTO DA DEFICIÊNCIA DE FERRO E PREVENÇÃO DA ANEMIA FERROPRIVA EM CRIANÇAS COM IDADE PRÉ-ESCOLAR: CARACTERIZAÇÃO DO QUELATO PEPTÍDEO-FERRO, AVALIAÇÃO DO TEOR DE FERRO E ANÁLISE SENSORIAL

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Sorocaba/SP

2012

Tatiane Takeda

PREPARAÇÃO DE PÃO FORTIFICADO PARA TRATAMENTO DA DEFICIÊNCIA DE FERRO E PREVENÇÃO DA ANEMIA FERROPRIVA EM CRIANÇAS COM IDADE PRÉ-ESCOLAR: CARACTERIZAÇÃO DO QUELATO PEPTÍDEO-FERRO, AVALIAÇÃO DO TEOR DE FERRO E ANÁLISE SENSORIAL.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:

Ass.: _____

Pres.: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

Universidade de Sorocaba - UNISO

Ass.: _____

1º Exam.: Prof. Dr. Newton Andréo Filho

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Ass.: _____

2º Exam.: Profª Drª Maricene Sabha

Universidade de Sorocaba - UNISO

Dedico este trabalho a minha amada filha Tânia, por preencher minha vida com amor e alegrias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador prof Dr. Marco Vinicius Chaud por seu profissionalismo e amizade, pelos momentos de dedicação e paciência que foram de grande importância na elaboração dessa pesquisa e em minha formação acadêmica.

À minha co-orientadora Prof^a Ms. Luciane Sant'Ana de Araújo, por ter se revelado uma grande amiga e companheira no decorrer dos anos, em especial nessa jornada do mestrado.

À minha família, por seu apoio em todos os momentos de dificuldade, e por compartilharem comigo as alegrias e conquistas. Aos meus amigos que sempre estiveram presentes e me apoiaram em todos os meus desafios, em especial o Prof. Dr. Newton Andréo Filho.

À minha chefe e amiga Bruna Bornia Passos, e meus colegas de trabalho e amigos do Apoio 3 por sua compreensão e incentivo nos momentos que precisei me ausentar do setor para os estudos. Em especial Marco Floriano Júnior e a prof^a Maria Angela Severino, por sua importante colaboração no processo de criação e fabricação dos pães.

À profa Marta Maria Duarte Carvalho Vila por sua colaboração nesse estudo, assim como, a Profa Dra. Maria Izabel M. S. Bueno, Dra Juliana Terra e M.S.Gustavo G. Shimamoto do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Unicamp pela realização das análises de Fluorescência de Raios X.

A todo o corpo docente do Mestrado em Ciências Farmacêuticas, que brilhantemente ajudou em minha formação profissional e acadêmica durante o mestrado.

À diretoria da Educação e diretoria da Saúde da cidade de Porto Feliz, às nutricionistas Camila Biscaro e Luciana Ambrosini, à diretora e funcionários da creche Juvenal de Campos, que permitiram e colaboraram para a realização dessa pesquisa com as crianças.

A todas as pessoas que colaboraram com a pesquisa de forma direta ou indiretamente, e finalmente às crianças que participaram e possibilitaram a realização deste estudo.

RESUMO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a anemia ferropriva como um dos maiores problemas de saúde pública existente no mundo. O Brasil é citado como o quarto país com maior taxa de anemia em crianças pré-escolares, mostrando a preocupante taxa de 54,9% das crianças afetadas por esta doença. Essa grave carência nutricional acarreta consequências negativas sobre o desenvolvimento físico e cognitivo das crianças, além das co-morbidades como propensão a doenças infecciosas. Desta forma, a fortificação alimentar é uma importante estratégia no combate e prevenção a anemia ferropriva, e a sua eficácia depende da seleção adequada do alimento a ser fortificado. O pão é um alimento que vem sendo utilizado em estudos de enriquecimentos com minerais e outros nutrientes, por tratar-se de um alimento bastante difundido e uma das principais fontes calóricas de muitos países. A análise sensorial é uma das ferramentas mais utilizadas na avaliação da aceitabilidade de alimentos fortificados. O objetivo deste trabalho foi preparar pães fortificados com ferro quelado a peptídeo da caseína, e avaliar a aceitação dos pães fortificados em um grupo de crianças em idade pré-escolar. O teor de ferro presente no quelato peptídeo-ferro e nos pães fortificados foi determinado utilizando espectroscopia de fluorescência de raio X. O quelato peptídeo ferro foi caracterizado utilizando espectroscopia de infravermelho, espectroscopia por difração de raios-X e calorimetria exploratória diferencial. Para avaliar a aceitação dos pães junto a um grupo de crianças em idade pré-escolar foi utilizado o modelo de teste de aceitabilidade sugerido pelo Fundo Nacional de Desenvolvimento na Educação (FNDE) por meio de escala hedônica facial de cinco pontos. O teor de ferro no quelato foi 145,629 mg/g. O teor de ferro nos pães de leite sem e com quelato 6g, 9g e temperado foi respectivamente, 0,342; 4,592; 6,254 e 5,915 mg/g de amostra. O resultado do estudo por espectroscopia de infravermelho, e difração de raios X e calorimetria exploratória diferencial mostrou que o elemento ferro está quelado ao peptídeo da caseína. Os pães fortificados com ferro quelado a peptídeos da caseína foram obtidos em escala piloto e a tecnologia desenvolvida está pronta para ser transferida para panificadoras públicas ou privadas. A aceitação do pão fortificado pelas crianças foi plenamente satisfatória, indicando que este produto poderia ser incluído na merenda escolar para crianças nesta faixa etária.

Palavras- Chave: Anemia ferropriva. Fortificação alimentar. Teste de aceitabilidade.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) classifies iron deficiency anemia as one of the major public health problems existing in the world. Brazil is cited as the fourth country with major rate of anemia at children preschool, showing the worrying rate of 54.9% of children affected by the disease. This severe nutritional deficiency causes negative consequences about the physical and cognitive children development, in addition to the co-morbidities such as propensity of infectious diseases. Thus, the food fortification is an important strategy to combat and prevent the iron deficiency anemia, and their effectiveness depend on appropriate selection of food to be fortified. Bread is a food that has been used on studies of enrichments with minerals and other nutrients, because it is a widespread food and one of principal source of calories in many countries. The sensory analysis is one of the most used tools in evaluating the acceptability of fortified foods. The objective of this work was to prepare fortified breads with the iron chelate peptide of casein, and to evaluate the acceptability of fortified breads on a group of preschool children. The iron content present in iron-chelating peptide and fortified bread was determined using X-ray spectroscopy fluorescence. The iron-chelating peptide was characterized using infrared spectroscopy, X-ray diffraction spectroscopy and differential scanning calorimetry. To evaluate the acceptance of the bread within a group of children in preschool age, it was used the test model suggested by National Fund for Development in Education (ENDF) through facial hedonic scale with five points. The iron content in milk breads without and with chelate 6g, 9g and temperate was respectively, 0,342; 4,592; 6,254 and 5,915 mg/g of sample. The results of the study by infrared spectroscopy, X-ray diffraction and differential scanning calorimetry showed that the element iron is chelated to peptide of casein. The breads fortified with iron chelate to peptides of casein were obtained in pilot scale and the technology developed is ready to be transferred to public and private bakeries. Acceptance of bread fortified by the children was fully satisfactory, indicating that this product could be included in school meals for preschoolers.

Keywords: Iron deficiency anemia. Food fortification. Test of acceptability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma ilustrado de modo de preparo do pão de leite fortificado com quelato peptídeo-ferro.....	45
Figura 2	Fluxograma ilustrado de modo de preparo do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro.....	46
Figura 3	Fluxograma ilustrado do processo de fabricação dos pães fortificados.....	47
Figura 4	Espectroscopia por IVTF da caseína (A) e do quelato peptídeo-ferro (B).....	53
Figura 5	Espectros de difração de raios X do hidrolisado de caseína de do quelato peptídeo-ferro.....	54
Figura 6	Espectros de calorimetria diferencial do hidrolisado de caseína com o quelato peptídeo-ferro.....	55
Figura 7	Representação gráfica dos teores de ferro (\pm DP), no pão temperado (PCQ), no pão de leite com (PLQ) e sem quelato (PL) e na farinha utilizada para fabricação dos pães.....	58
Figura 8	Resultado da aceitação dos pães de leite fortificado com o quelato peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB.....	60
Figura 9	Média dos resultados da aceitação do pão de leite fortificado com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB).....	61
Figura 10	Resultado de o consumo alimentar do pão de leite fortificado com o quelato de peptídeo-ferro em cada turma: IA,IIA e IIB turma.....	61
Figura 11	Média dos resultados do consumo alimentar do pão de leite fortificado com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB)...	62
Figura 12	Resultado da repetição do pão de leite fortificado com quelato peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB.....	63
Figura 13	Média dos resultados da repetição do pão de leite fortificado com quelato peptídeo-ferro nas três turmas (IA, IIA e IIB).....	63
Figura 14	Resultado da aceitação do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB.....	64
Figura 15	Média dos resultados do teste de aceitação do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB).....	64
Figura 16	Resultado de o consumo alimentar do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB.	66

Figura 17	Média dos resultados do consumo alimentar do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB).....	66
Figura 18	Resultado da repetição do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB.....	67
Figura 19	Média dos resultados da repetição do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB)...	67
Figura 20	Média dos resultados da aceitação do pão de leite e pão de leite temperado fortificados com quelato peptídeo-ferro nas três turmas (IA, IIA e IIB).....	68
Figura 21	Média dos resultados do consumo alimentar do pão de leite e pão de leite temperado fortificados com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB).....	69
Figura 22	Média dos resultados de repetição do pão de leite e pão de leite temperado fortificados com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Prevalência de anemia ferropriva em crianças pré-escolares.....	16
Tabela 2	Recomendações dietéticas diárias de ferro em miligramas, de acordo com a EAR, RDA/ AI e UL.....	25
Tabela 3	Principais alimentos fontes de ferro heme e não heme e suas respectivas quantidades de ferro.....	26
Tabela 4	Recomendação diária de ferro de acordo com o grau de biodisponibilidade de ferro da dieta (mg/dia).....	28
Tabela 5	Composição dos pães utilizados nas receitas dos pães de leite.....	44
Tabela 6	Informações nutricionais do pão de leite e pão de leite fortificado com quelato de ferro.....	56
Tabela 7	Média e desvio padrão do teor de ferro obtida por Fluorescência de Raio-x em amostras de quelato peptídeo ferro, pão de leite sem ferro, pão de leite e pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Prevalência da anemia ferropriva.....	15
2.2 Anemia ferropriva.....	18
2.3 Deficiência de ferro.....	20
2.3.1 Fisiopatologia da deficiência de ferro e anemia ferropriva.....	21
2.3.2 Causas e consequências da deficiência de ferro e anemia ferropriva	22
2.4 A nutrição, necessidades e principais fontes de ferro.....	23
2.5 Biodisponibilidade do ferro presente na dieta.....	27
2.6 Diagnóstico e tratamento da deficiência de ferro.....	29
2.7 Programas de combate a anemia.....	32
2.8 Fortificação dos alimentos.....	33
3 OBJETIVO GERAL.....	39
3.1 Objetivos específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Material.....	40
4.1.1 Matéria Prima.....	40
4.1.2 Equipamentos.....	40
4.2 Métodos.....	41
4.2.1 Preparação do quelato peptídeo-ferro.....	41
4.2.2 Caracterização do quelato peptídeo-ferro.....	41
4.2.2.1 Espectroscopia por infravermelho com Transformada de Fourier.....	41
4.2.2.2 Difração por raio-X.....	42
4.2.2.3 Calorimetria exploratória diferencial.....	42
4.2.3 Testes para preparação dos pães fortificados.....	42
4.2.3.1 Preparação dos pães fortificados.....	44

4.2.4 Determinação do valor nutricional dos pães fortificados.....	47
4.2.5 Fluorescência de Raios X (FRX) para determinação do teor de ferro..	47
4.3 População em estudo.....	48
4.4 Dados Estatísticos.....	48
4.5 Teste de aceitação.....	49
4.5.1 Preparação e armazenamento dos pães fortificados para realização do teste de aceitação.....	50
4.5.2 Aplicação do teste de aceitação dos pães fortificados.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Preparação do quelato peptídeo-ferro.....	52
5.2 Caracterização do quelato peptídeo-ferro.....	52
5.2.1 Espectroscopia de infravermelho.....	52
5.2.2 Espectroscopia por difração de Raios X.....	53
5.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	54
5.3 Processo de fabricação dos pães fortificados.....	55
5.4 Informações nutricionais dos pães.....	56
5.5 Fluorescência de Raios X.....	56
5.6 Teste de aceitação.....	58
6 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO A – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	78
ANEXO B – Modelo do termo de consentimento livre esclarecido.....	80
ANEXO C - Modelo teste de aceitabilidade.....	82

1 INTRODUÇÃO

A anemia ferropriva é um grave problema de saúde pública que acomete principalmente lactentes, crianças em idade pré-escolar e gestantes. Essa carência nutricional atinge milhões de pessoas no mundo todo, e sua prevalência é maior nos países em desenvolvimento.

Na caracterização da anemia ferropriva são utilizados duas referências para diagnóstico, uma delas denominada Método Padrão e a outra Prevalência Padronizada. Estas referências para a estimativa de prevalência de anemia ferropriva não estão devidamente estabelecidas, fato que resulta em dados diferentes e até mesmo conflitantes para estudos realizados em uma mesma região.

No Brasil é possível encontrar dados de anemia em crianças pré-escolar que variam desde 30,2% até 63,2%. De uma forma geral, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) o Brasil é o quarto país com maior índice de anemia ferropriva em crianças em idade pré-escolar ficando atrás somente da Nigéria (76,1%), Índia (74,3%) e Camboja (63,4%).

A deficiência de ferro é considerada um estágio de desordem nutricional que antecede a anemia ferropriva. Ela acontece quando as reservas nutricionais de ferro se esgotam, devido ao balanço negativo entre a ingestão e necessidades de ferro. Esse balanço negativo acontece devido a fatores biológicos, sociais, econômicos e culturais.

A anemia ferropriva é um indicador de saúde precária e nutrição inadequada, trazendo graves consequências à saúde, sendo as principais delas a propensão a doenças infecciosas e atrasos irreversíveis no desenvolvimento físico e cognitivo das crianças.

Além de suprir as necessidades de ferro, é importante verificar a biodisponibilidade do ferro presente nas refeições, ou seja, a quantidade de ferro que será realmente absorvida. De forma resumida, a absorção de ferro presente da dieta é influenciada pela quantidade, forma química do ferro presente, tipo de alimento consumido em uma mesma refeição, além do estado de saúde e estado nutricional de ferro do indivíduo.

No Brasil, o Programa Nacional de Suplementação Medicamentosa de ferro aos grupos de risco foi implantado a partir de 1998. Outra estratégia de política pública no combate a anemia ferropriva, foi a resolução RDC nº 344, que determina

que a partir de junho de 2004 toda farinha de trigo e farinha de milho deve vir acrescida de 4,2mg de ferro, e 150 µg de ácido fólico para cada 100g das farinhas.

O processo de fortificação, enriquecimento ou adição, é aquele no qual se acrescenta ao alimento, um ou mais nutrientes, de acordo com os parâmetros legais, e com o objetivo de melhorar o valor nutritivo ou prevenir alguma deficiência nutricional na alimentação da população. A eficácia da fortificação de alimentos com ferro depende de três fatores principais: fonte de ferro, tipo e aceitação do alimento.

Para que um novo alimento seja oferecido como parte integrante de um cardápio é sugerida a realização de teste de aceitação com a população alvo. Na merenda escolar, o teste de aceitação é obrigatório e o índice de aceitabilidade não deve ser inferior a 85%. Portanto, a análise sensorial é uma das ferramentas mais utilizadas na avaliação da aceitabilidade de alimentos fortificados.

O enriquecimento de pães fortificados com ferro, de alto valor biológico relativo, pode ser uma estratégia útil no combate à deficiência de ferro e anemia ferropriva. O pão, por ser um alimento de baixo custo e diariamente consumido por indivíduos de todas as faixas etárias, pode contribuir para a redução desta doença nutricional, cujas consequências são graves e permanentes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Prevalência da anemia ferropriva

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a anemia ferropriva como um dos maiores problemas de saúde pública existente no mundo. Esta doença acomete principalmente lactentes, crianças pré-escolares, adolescentes, mulheres em idade fértil e gestantes (WHO, 1989; WHO, 2001; RIBEIRO; SIGULEM, 2008; SANTANA; NORTON; FERNANDES, 2009; BORTOLINI; FISBERG, 2010). Embora, esta preocupação perdure por mais de meio século, o quadro mundial da doença não tem alterado e as consequências atingem milhões de pessoas no mundo todo.

Em países desenvolvidos, onde se pressupõe uma situação mais favorável, a prevalência de anemia em crianças pré-escolares é em torno de 12%. No entanto esta taxa é consideravelmente menor quando comparada a países em desenvolvimento, a qual pode variar entre 30 e 60%. Essa diferença pode ser justificada ao analisar os índices, muito maiores, do consumo de carne e alimentos industrializados enriquecidos. Sem considerar o acesso à assistência médica, estes alimentos têm no ferro um valor biológico relativo muito mais alto que a média de outras fontes nutricionais, como grãos, verduras e frutas (DA MATTA et al., 2005; WHO, 2008). Estudos pontuais realizados no final da década de 90 e início do século 21 mostraram que a prevalência de anemia em periferia de grandes cidades norte-americanas foi similar a dados encontrados em países em desenvolvimento (BOTH; AUKETT, 1997; ALMEIDA et al., 2004).

A anemia é encontrada em cerca de 30 a 48% da população dos países em desenvolvimento. A OMS, em 2001, estimou que 2 bilhões de pessoas no mundo eram ferropênicas, e que nesses países, com alta prevalência de anemia, existia, para cada indivíduo com deficiência de ferro, um indivíduo com anemia (WHO, 2001).

Em extensa revisão publicada por Childs et al. (1997), estão descritos estudos realizados na Inglaterra. Em Birmingham os estudos mostraram que ao longo de 10 anos os índices de anemia ferropriva não mudaram na periferia da cidade independente da origem européia (19%), asiática (27%) e africana (29%) e outras

descendência (28%). No estudo de Aukett et al. (1986) realizado com crianças que residiam nas periferias das grandes cidades foi encontrado índice de 27% de prevalência de anemia em crianças asiáticas, e 18% em outras regiões da Europa. Os resultados obtidos no continente asiático em 1997 são iguais aos obtidos 1985 (BOTH; AUKETT, 1997). Considerando que a população no continente asiático e africano vem aumentando é possível que a anemia ferropriva esteja crescendo, significativamente, em números absolutos.

Conforme classificação descrita pela OMS (2001), a prevalência de anemia ferropriva é considerada leve entre 5 e 19,9%, moderada entre 20 e 39,9% e severa igual ou maior que 40%. Desta forma, dados da prevalência de anemia em crianças pré-escolares, no Brasil e outros países, segundo a OMS (2008) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Prevalência de anemia ferropriva em crianças pré-escolares

País	Estimativa de Anemia	Classificação da Anemia
Nigéria	76,1%	Severa
Índia	74,3%	Severa
Camboja	63,4%	Severa
Brasil *	54,9%	Severa
Bolívia *	51,6%	Severa
Peru *	50,4%	Severa
Chile *	24,4%	Moderada
Uruguai *	19,1%	Leve
Argentina *	18,1%	Leve
Espanha	12,9%	Leve
Portugal	12,7%	Leve
Japão	10,6%	Leve
Inglaterra	8,0%	Leve
EUA	3,1%	Não é um problema de saúde pública

Fonte: WHO (2008). * Países da América Latina

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

Segundo a classificação apresentada na Tabela 1, mesmo que em menor grau de severidade, a anemia continua afetando tanto os países em desenvolvimento como os países desenvolvidos, trazendo consequências à saúde humana e ao desenvolvimento social e econômico.

De acordo com estes dados o Brasil é o quarto país com maior índice de anemia em crianças pré-escolares, atrás somente da Nigéria (76,1%), Índia (74,3%) e Camboja (63,4%); o PIB destes países é respectivamente 369,8 bilhões, 4,05 trilhões e 30,1 bilhões, e o PIB do Brasil é 2,19 trilhões. No cone sul, Argentina (18,1%), Uruguai (19,1%) representam índices menores que o Brasil (54,9%) e grau de classificação leve. Na América do Sul, além de Argentina e Uruguai os índices no Brasil são ligeiramente maiores que na Bolívia e Peru e o dobro do índice chileno. Este quadro mostra o descaso da 6ª potência econômica mundial com a saúde pública das populações menos favorecidas economicamente.

Nas últimas décadas, foi observada uma tendência de aumento da anemia em pré-escolares, a qual pode ser justificada pelo período de transição nutricional do país, decorrentes de mudanças nos hábitos alimentares, tais como: aumento no consumo de alimentos industrializados e diminuição no consumo de alimentos *in natura* (HEISLER et al., 2008; JORDÃO; BERNARDI; FILHO, 2009). Souto, Brasil e Taddei (2008), concluem que: embora, haja redução na prevalência de desnutrição, a anemia ferropriva, no Brasil, vem aumentando progressivamente ao longo dos anos. Esse aumento do número de crianças anêmicas ficou evidenciado no estudo de Monteiro et al. (2000), realizado no município de São Paulo, onde a prevalência de anemia passou de 35,6% na década de 1980 para 46,9% na década de 1990.

Embora não exista um levantamento nacional com dados de prevalência de anemia ferropriva em crianças pré-escolares (BAGNI et al., 2009), vários estudos pontuais mostram, frequentemente, elevados índices dessa doença, os quais podem variar de 30,2% em Pelotas (RS) a 63,2% em Viçosa (MG) conforme descritos a seguir:

Norton et al. (1996) em estudos realizados em Rio-Acima, MG, mostraram uma prevalência da anemia ferropriva variando de 16% quando avaliado pelo método padrão, até 36% quando avaliada por meio da prevalência padronizada, sendo maiores em regiões menos urbanizadas. Desta forma, pode se concluir que existe uma necessidade eminente de padronização para os parâmetros de avaliação e diagnóstico da anemia ferropriva.

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil cerca de 45% das crianças até cinco anos, apresentam algum grau de anemia ferropriva (ANVISA, 2002).

Segundo dados da última Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS), a prevalência de anemia em crianças menores de cinco anos foi de 20,9%. A região nordeste apresentou a prevalência mais alta de 25,5%, e a região norte apresentou a prevalência mais baixa de 10,4%. Nessa pesquisa foram analisadas 3.455 crianças (PNDS, 2006).

Em pesquisa realizada por Almeida et al. (2004) que fez um estudo transversal com 192 crianças em idade entre 12 e 72 meses, encontrou 62,5% de prevalência de anemia na cidade de Pontal (SP). O autor concluiu que a idade foi à variável mais afetada pelo estado nutricional do ferro, pois quanto maior a idade da criança, menor a prevalência de anemia apresentada.

Matta et al. (2005) encontraram 47,3% de prevalência de anemia, ao avaliar 865 crianças matriculadas em creches municipais na cidade do Rio de Janeiro. No estudo de Machado et al. (2005) foi encontrada 57,2% de prevalência de anemia ao avaliar 942 crianças entre 6 meses e 6 anos, freqüentadoras de creches beneficentes na cidade de São Paulo. Bueno et al. (2006) encontrou 68,8% de prevalência de anemia ao avaliar 330 pré-escolares atendidos em creches públicas também da cidade de São Paulo. Dado semelhante foi encontrado em pesquisa realizada no município de Viçosa (MG), que avaliou 171 crianças entre 12 e 60 meses, e encontrou prevalência de anemia de 63,2%, sendo que 43,5% das crianças anêmicas apresentaram anemia grave (MIRANDA et al., 2003).

De acordo com Vieira et al. (2007) foi encontrado 55,6% de prevalência de anemia ao avaliar 162 crianças entre 6 meses e 5 anos, frequentadoras de creche pública na cidade de Recife (PE). Muniz et al. (2007) encontrou 30,6% de prevalência de anemia ao avaliar 677 crianças menores de 5 anos no Acre. Dado semelhante foi verificado em pesquisa realizada no município de Pelotas (RS), onde foi encontrado 30,2% de prevalência de anemia em crianças menores de 5 anos.

2.2 Anemia ferropriva

Anemia é um indicador para saúde precária e para nutrição inadequada. O seu efeito mais grave para a saúde é aumentar o risco de mortalidade materno e infantil, principalmente, devido à anemia severa. Além de danos físicos como

redução da força muscular, e das co-morbidades como propensão a doenças infecciosas, existem consequências negativas dessa carência nutricional sobre o desenvolvimento físico e cognitivo das crianças. Nestes casos a anemia pode causar alterações na inteligência nas fases posteriores a infância, atrasos no crescimento e desenvolvimento psicomotor e baixo rendimento escolar (DA MATTA et al., 2005; RIBEIRO; SIGULEM, 2008; SOUTO; BRASIL; TADDEI, 2008; ARCANJO; AMANCIO; BRAGA, 2009; VELLOZO; FISBERG, 2010).

Na fase adulta a anemia ferropriva pode afetar até 30% da capacidade produtiva no trabalho (WHO, 2001; WHO, 2008), incluindo déficit de atenção no uso de máquinas, ferramentas e ao dirigir por longos períodos. Neste caso, motoristas de ônibus, taxi e transporte de carga podem ser seriamente afetados. Calcula-se que a perda de produtividade associada à anemia seja 5% em trabalhos leves, 17% para trabalhos pesados e 4% quando envolve os demais tipos de trabalhos (VELLOZO; FISBERG, 2010).

Analisando a relação entre anemia ferropriva e índice de desenvolvimento humano (IDH), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e outros estudos relacionam, para um longo prazo, a formação de mão de obra não qualificada ao menor nível de desenvolvimento mental em crianças com anemia ferropriva (WHO, 2001; VELLOZO; FISBERG, 2010).

A anemia ferropriva comumente acomete gestantes, fato que preocupa não apenas em relação a segurança da mãe, mas também com os estoques de ferro do recém-nascido. Infelizmente, o estoque de ferro em mulheres grávidas é considerado deficiente, mesmo nos países desenvolvidos. Durante a gravidez, tanto para a mãe quanto para a criança, a anemia está associada há vários fatores adversos, como o aumento do risco de hemorragias, sepse, mortalidade materna, mortalidade perinatal e baixo peso ao nascer. Nos países em desenvolvimento, estima-se que mais da metade de mulheres grávidas sofram de anemia ou algum grau de deficiência de ferro (WHO, 2001).

Em 1992, a OMS destacou que a maioria dos países tinham programas para suplementação de ferro principalmente para gestantes. No entanto, segundo esta mesma organização, a maioria desses programas não possui um sistema para monitoramento, fato que prejudica a avaliação da efetividade dos tratamentos

(WHO, 2001). Esta preocupação equivale a dizer que as políticas públicas para suprirem esta carência nutricional não funcionam na maioria dos países. A veracidade desta dedução pode ser ratificada através dos alarmantes índices de prevalência desta doença.

A anemia ferropriva é o resultado de uma ampla variedade de causas que pode ser isolada, mas é mais frequente coexistirem com parasitose intestinal e outras carências nutricionais. Mundialmente, a deficiência de ferro é conhecida como a mais significativa contribuição para o início da anemia, sendo considerada como um estágio de desordem nutricional grave, que antecede a anemia. Desta forma, a anemia por deficiência de ferro desenvolve-se quando a deficiência de ferro torna-se severa (WHO, 2001; WHO, 2008; BORTOLINI; FISBERG, 2010).

A prevalência de anemia ferropriva tem sido usada com frequência como sinalizador para deficiência de ferro, principalmente ao considerar que 50% dos casos de anemia são devido à deficiência de ferro. Vale ressaltar que essa porcentagem pode variar entre os grupos populacionais e diferentes áreas, de acordo com as condições do local (WHO, 2001; WHO, 2008; BORTOLINI, FISBERG, 2010).

2.3 Deficiência de ferro

Em 2002, a deficiência de ferro foi citada entre os fatores que mais contribuem com a carga de doença global (WHO, 2008). E é sugerida como um dos 10 fatores de risco para doenças, incapacidade física e mental e morte no mundo atual (SOUTO; BRASIL; TADDEI, 2008).

A deficiência de ferro acontece quando as reservas nutricionais de ferro se esgotam, devido ao balanço negativo entre a ingestão e as necessidades de ferro. Esse balanço negativo acontece devido a uma série de fatores biológicos, sociais, econômicos e culturais que agem sobre o indivíduo. Baseado nessas informações, conclui-se que para sua eficácia, é importante que o tratamento da anemia e deficiência de ferro seja o conjunto de várias estratégias de combate a essa carência nutricional (WHO, 2001; ALMEIDA et al., 2004).

Tanto quanto a anemia ferropriva, a deficiência de ferro pode ter como consequência prejuízos fisiológicos sérios em todas as faixas etárias, independente do sexo ou raça. As consequências mais graves são insuficiência no transporte de oxigênio, no metabolismo nuclear e oxidativo, e na transcrição gênica; assim como, prejuízos na função cognitiva da criança e do adolescente. No entanto, como a deficiência de ferro não é detectada nos hemogramas, o início do tratamento é mais demorado, podendo levar à anemia ferropriva, expondo um número maior de pessoas ao risco deste estágio nutricional. Além disso, a deficiência de ferro tem comprometido funções gastrointestinais e alterado padrões na produção de hormônios e do metabolismo (NABESHIMA et al., 2005; REZENDE et al., 2009; SANTANA; NORTON; FERNANDES, 2009).

O ferro é componente de várias proteínas, incluindo enzimas e a hemoglobina, a qual tem um importante papel no transporte do oxigênio para os tecidos. É nos eritrócitos circulantes que estão presentes aproximadamente dois terços do ferro existente no corpo humano (BORTOLINI; FISBERG, 2010). A adequada entrega de oxigênio para todos os tecidos, incluindo mucosa oral, peridental e os dentes, é essencial para a manutenção da saúde do corpo. Níveis baixo de ferremia é a causa mais comum que atua no comprometimento da oxigenação dos tecidos, pois o ferro é o centro de transporte de oxigênio, através da hemoglobina e mioglobina (HATIPOGLU et al., 2012).

2.3.1 Fisiopatologia da deficiência de ferro e anemia ferropriva

A deficiência de ferro é o resultado de um longo tempo de balanço negativo nas reservas de ferro. No início, os níveis de hematócrito e hemoglobina continuam normais, porém as reservas de ferro na forma de ferritina e hemossiderina diminuem deixando de desempenhar seu importante papel no organismo. Em seguida, o nível sérico de ferro diminui, e concomitantemente a capacidade de ligação do ferro na transferrina aumenta, tendo como resultado um decréscimo da percentagem de saturação do ferro na transferrina. Nessa fase, que pode ser chamada de deficiência de ferro sem anemia, ocorre um pequeno decréscimo da circulação das células vermelhas (OSORIO, 2002; WHO, 2008).

Com o tempo, os estoques de ferro passam a ser depletados, levando à anemia por deficiência de ferro. Essa fase caracteriza-se pela diminuição nos níveis de hematócrito e hemoglobina, ocorrendo mudanças citoformológicas e levando a distúrbios no mecanismo do transporte de oxigênio. Esta fase apresenta como principais sinais e sintomas as alterações da pele e mucosas (palidez e glossite), alterações gastrointestinais (estomatite e disfagia), fadiga, fraqueza, palpitação, redução da função cognitiva, do crescimento e desenvolvimento psicomotor, além de afetar a termorregulação e imunidade da criança (WHO, 2008; OSORIO, 2002; BUENO et al., 2006).

As principais características da anemia ferropriva são: diminuição ou ausência das reservas de ferro, baixa concentração férrica no soro, fraca saturação da transferrina, concentração escassa da hemoglobina e redução do hematócrito.

A necessidade de ferro das células é expressa em todos os tecidos através de um tipo de receptor de transferrina, portanto, a ausência do fornecimento de ferro para o eritrócito está associada com a insuficiência de fornecimento de ferro para todos os outros tecidos. Desta forma, é possível detectar a diminuição dos estoques de ferro através de exames laboratoriais, incluindo hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular, concentração de volume corpuscular, capacidade total de ligação de ferro, saturação da transferrina e zinco protorfirina (WHO, 2008).

2.3.2 Causas e consequências da deficiência de ferro e anemia ferropriva

O risco de deficiência de ferro pode ser aumentado considerando algumas condições, tais como: baixo consumo de fontes alimentares ricas em ferro com alto valor biológico, consumo insuficiente de vitamina C, prejuízo na absorção de ferro pela presença de fitatos e compostos fenólicos da dieta, associados a períodos da vida onde a necessidade de ferro é maior, e a oferta de outros micronutrientes como: vitamina A, B12, folato e riboflavina são menores (WHO, 2006; WHO, 2008; ARCANJO; AMANCIO; BRAGA, 2009; REZENDE et al., 2009).

Entre outras causas responsáveis por baixar a concentração de hemoglobina no sangue, pode se citar: grande perda de sangue durante a menstruação, infecções por parasitas, tais como, ascaridíase e esquistosomose, infecções agudas ou

crônicas, incluindo malária, câncer, tuberculose e HIV, e a deficiência de outros nutrientes, como por exemplo, vitamina A e B12, folato, riboflavina e cobre (WHO, 2008; ARCANJO; AMANCIO; BRAGA, 2009).

Estudo na Costa Rica comparou crianças que tinham anemia moderada na infância, com crianças não anêmicas na mesma faixa etária e constatou que as crianças que tiveram anemia moderada apresentaram piores resultados em testes de avaliação do quociente de inteligência (QI) e outros testes cognitivos. Infelizmente, os efeitos da anemia na infância não são prováveis de serem corrigidos posteriormente por suplementação de ferro (FOX; EAGLES; FAIRWEATHER-TAIT, 1997; WHO, 2001; VELLOZO; FISBERG, 2010).

Nos países desenvolvidos foi estimado que 10 a 20% das crianças pré-escolares são anêmicas com 1 ano de idade, e 30 a 80% em países em desenvolvimento. Possivelmente, essas crianças apresentarão atrasos no desenvolvimento psicomotor, e quando alcançarem a idade escolar terão prejuízos nos testes de linguagem, habilidades motoras e coordenação, podendo variar entre 5 a 10 pontos de deficit no QI (WHO, 2001).

2.4 A nutrição, necessidades e principais fontes de ferro

A nutrição exerce um papel importante e definitivo na promoção da saúde de uma população. Durante a infância e adolescência, uma alimentação nutricionalmente correta, proporciona crescimento e desenvolvimento adequado, menor risco de doenças na fase adulta e senil, e melhor qualidade de vida (VELLOZO; FISBERG, 2010).

Entretanto, quando o consumo de energia e nutrientes está abaixo das necessidades, pode ocorrer o aparecimento de doenças carenciais. Desta forma, a depleção de reservas, o metabolismo individual, processos infecciosos, aumento das demandas nutricionais, a hiperatividade, o inadequado aproveitamento dos nutrientes, erros e restrições alimentares são alguns dos fatores que podem interferir na adequada nutrição de um indivíduo, e levar a deficiências nutricionais (VELLOZO; FISBERG, 2010; BERNARDI et al., 2011).

Além disso, estudos recentes sugerem que diversas doenças crônicas degenerativas não transmissíveis, como cardiovasculares, hipertensão, *diabete mellitus*, obesidade e osteoporose podem ser agravadas pela deficiência de micronutrientes (VELLOZO; FISBERG, 2010; BERNARDI et al., 2011).

Na faixa etária pré-escolar, as carências nutricionais mais comuns são: anemia ferropriva, deficiência de vitamina A e desnutrição (BERNARDI et al., 2011). Justificando, portanto, a importância de conhecer as recomendações de ferro para essa fase da vida.

As Recomendações de Ingestão Dietética (DRI – Dietary Reference Intakes) representam valores de recomendação de ingestão de ferro e outros nutrientes adotados pelos EUA e Canadá, sendo estes publicados desde 1980. O conjunto desses valores de referência foi elaborado por comitês de pesquisadores especialistas de vários institutos e agências de saúde destes países. As DRI's são compostas de várias categorias relacionadas às necessidades de nutrientes nas diferentes fases de vida. A EAR - Estimativa de Requerimento Médio (Estimated Average Requirement), corresponde à mediana da distribuição das necessidades de nutrientes, estudados através do levantamento do consumo alimentar de indivíduos saudáveis de mesmo sexo e fase de vida, atendendo até 50% das necessidades diárias. A RDA – Ingestão Diária Recomendada (Recommended Dietary Allowances) – provém da EAR, e deve atender as necessidades de um nutriente para 97% a 98% dos indivíduos saudáveis de um mesmo sexo e no mesmo estágio da vida. A AI – Ingestão Adequada (Adequate Intake) – é o valor de consumo recomendável, baseado em estudos populacionais na avaliação do consumo alimentar, nos casos que a RDA não pode ser estimada. A UL – Limite de Ingestão Máxima Tolerável (Tolerable Upper Level), que estipula o mais alto nível de ingestão de alguns nutrientes que não causará efeitos adversos a saúde da maioria das pessoas (BRIGGS, SAFALL; BEALL, 2003; AMAYA-FARFAN; DOMENE; PADOVANI, 2001; BORTOLINI; FISBERG, 2010).

A Tabela 2 apresenta os valores de referência da EAR, RDA complementada pela AI e UL para a ingestão diária de ferro para as faixas etárias mais acometidas pela anemia ferropriva.

Tabela 2: Recomendações dietéticas diárias de ferro em miligramas, de acordo com a EAR, RDA/AI e UL

Fase da Vida	EAR	RDA/ AI	UL
Lactentes			
0 – 6 meses	ND	0,27	40
7 – 12 meses	6,9	11	40
Crianças			
1 -3 anos	3,0	7,0	40,0
4 – 8 anos	4,1	10,0	40,0
Adolescentes			
9 – 13 anos (Feminino/Masculino)	5,7/ 5,9	8,0/ 8,0	40,0/ 40,0
14 -18 anos (Feminino/Masculino)	7,9/ 7,7	15,0/ 11,0	45,0/45,0
Gestantes			
19 – 50 anos	22	27	45
Mulheres			
19 – 50 anos	8,1	18	45
Homens			
>19 anos	6,0	8,0	45

Fonte: Bortolini e Fisberg (2010)

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

Obs: EAR - Estimativa de Requerimento Médio; RDA – Ingestão Diária Recomendada; AI – Ingestão Adequada; UL – Limite de Ingestão Máxima Tolerável; ND – Não determinado.

Conforme se pode visualizar na Tabela 2 (RDA/AI), na idade de 1 a 3 anos, a recomendação de ingestão é de 7 mg de ferro/dia e de 10 mg de ferro/dia na idade de 4 a 8 anos. Nessa fase o aporte de nutrientes é aumentado devido ao crescimento e desenvolvimento da criança, e considera-se a que o limite máximo de absorção de ferro alcançada pelo organismo seja de 18% (BORTOLINI; FISBERG, 2010).

Vale ressaltar, que existem dois tipos diferentes de ferro presentes na dieta: ferro heme e o ferro não heme. O ferro heme é constituinte da hemoglobina e da mioglobina, e está presente nas carnes de boi, suína, peixe e ave. Esse tipo de ferro contribui com a menor fração do total de ferro ingerido, e sua absorção é de 20% a 30%. A forma mais consumida, o ferro não heme, é encontrado em diferentes concentrações nos alimentos de origem vegetal, e sua absorção é de 2% a 10% (WHO, 1989; WHO, 2004).

Na Tabela 3 podem ser observados alguns alimentos fontes de ferro e as respectivas quantidades de ferro por porção (TACO, 2006).

Tabela 3: Principais alimentos fontes de ferro heme e não heme e suas respectivas quantidades de ferro

Alimentos	Quantidade (100g)	Ferro (mg)
Ferro Heme		
Carne magra (lagarto)	1 bife médio	3,2
Carne gorda	1 bife médio	2,9
Fígado de boi	1 bife médio	8,2
Frango (peito do frango)	1 pedaço médio	1,3
Coração de frango	12 unidades médias	3,7
Carne de porco gorda	1 pedaço médio	2,5
Carne de porco magra	1 pedaço médio	2,9
Peixe (merluza)	1 filé médio	0,9
Peixe (dourado)	1 filé médio	1,7
Sardinha (conserva)	5 colheres de sopa	3,2
Ferro não heme		
Ovo	2 unidades	3,2
Feijão cozido	1 concha média	1,5
Grão de bico	3 colheres de sopa	2,3
Lentilha cozinha	1 concha média	5,6
Ervilha	3 colheres de sopa	1,7
Agrião	1 prato raso	1,9
Alface	1 prato raso	1,3
Almeirão	1 prato raso	1,7
Chicória	1 prato raso	1,7
Couve	1 prato raso	2,6
Espinafre	1 prato raso	3,3
Vagem	3 colheres de sopa	1,4
Beterraba	3 colheres de sopa	0,8

-Fonte: TACO (2006).

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

Pode se visualizar na Tabela 3 que os alimentos considerados as melhores fontes de ferro, são de origem animal (ferro heme) (ARCANJO; AMANCIO; BRAGA, 2009). Esses alimentos estão presentes nas refeições principais, como almoço e jantar, e são responsáveis por encarecer a refeição, informação que esclarece o fato da anemia e deficiência de ferro ter uma prevalência maior na população, economicamente, mais carente.

Em estudo transversal de Bernardi et al. (2011), na cidade de Caxias do Sul (RS), foi avaliado a ingestão de ferro por 362 pré-escolares entre 2 e 6 anos, nas escolas de educação infantil e domicílios. Como resultado dessa pesquisa foi encontrado que 56,5% do ferro ingerido pelas crianças foi fornecido pela escola de educação infantil, fato que pode ser justificado considerando que as crianças realizavam as principais refeições do dia, como almoço e pré-janta, na escola.

2.5 Biodisponibilidade do ferro presente na dieta

Além de suprir as necessidades de ferro, é importante verificar a biodisponibilidade do ferro presente nas refeições, ou seja, a quantidade de ferro que será realmente absorvido. A biodisponibilidade depende dos fatores intrínsecos, que são as mudanças fisiológicas que acontecem no organismo, como idade, sexo, doenças e necessidades de cada pessoa; e fatores extrínsecos, que estão relacionados diretamente com a alimentação do indivíduo (VITOLLO; BORTOLINI, 2007; VELLOZO; FISBERG, 2010; BORTOLINI; FISBERG, 2010).

Desta forma, os hábitos alimentares de uma população interferem diretamente na biodisponibilidade e aproveitamento do ferro ingerido (WHO, 1989; ARCANJO; AMANCIO; BRAGA, 2009). Vale ressaltar, que estratégias para melhorar a biodisponibilidade de ferro são necessárias, considerando que muitos alimentos consumidos em países pouco desenvolvidos têm a predominância de inibidores da absorção de ferro da dieta, principalmente do ferro não heme (OLIVARES et al., 1997).

A biodisponibilidade de minerais pode ser influenciada negativamente pela presença de fitatos, polifenóis, oxalatos, taninos e flavonóides, ou positivamente, pela presença de ácido ascórbico, ácido cítrico, lactose e frutose (VELLOZO, FISBERG, 2010).

No Quadro 1 é apresentada a variação da absorção de ferro de acordo com cada tipo de dieta (WHO, 2008). Conforme pode ser visualizado neste quadro, a dieta pode ser classificada em três categorias de acordo com a biodisponibilidade de ferro: baixa, intermediária e alta, cuja absorção pode variar entre 1 e 9%, 10 e 15% e acima de 15%, respectivamente. Nas dietas com maior quantidade de alimento de origem animal o ferro tem maior biodisponibilidade, devido à presença de ferro-heme. Existe uma relação entre a população de baixa renda e dieta com baixa biodisponibilidade de ferro, pois os alimentos fontes desse mineral são de custo mais elevado, e conseqüentemente estão mais ausentes na dieta de famílias carentes.

Quadro 1: Biodisponibilidade e variação na absorção de ferro em relação ao tipo de dieta consumida

Tipo de Dieta	Variação da absorção de ferro (%)	Classificação
Dietas baseadas em cereais, raízes e tubérculos, ausentes de carnes, peixes, aves e vitamina C, e com presença de inibidores da absorção de ferro.	1 a 9	Biodisponibilidade baixa
Dietas com cereais, raízes e tubérculos, com alguma quantidade de carnes, peixes, aves, frutas e vegetais ricos em vitamina C.	10 a 15	Biodisponibilidade intermediária
Dietas diversificadas contendo grande quantidade de alimentos de origem animal, e alimentos ricos em vitamina C.	Acima de 15	Biodisponibilidade alta

Fonte: adaptado de WHO (2008)

A Organização Mundial da Saúde estimou recomendações de ingestão de ferro considerando a biodisponibilidade de ferro presente na dieta. Diferentemente das DRI's, as "Recomendações de Ingestão" – (RNIs) estabelecem quatro parâmetros de ingestão de ferro para o mesmo ciclo de vida. Na Tabela 4 estão descritas as recomendações diárias de ingestão de ferro para diferentes fases da vida, de acordo com a biodisponibilidade do tipo de dieta (Quadro 1).

Tabela 4: Recomendação diária de ferro de acordo com o grau de biodisponibilidade de ferro (mg/dia) da dieta, segundo a RNIs

Idade (anos)	Biodisponibilidade na Dieta			
	15%	12%	10%	5%
Lactentes				
0,5 – 1	6,2	7,7	9,3	18,6
Crianças				
1-3	3,9	4,8	5,8	11,6
4 – 6	4,2	5,3	6,3	12,6
7 – 10	5,9	7,4	8,9	17,8
Mulheres				
11 – 14	21,8	27,7	32,7	65,4
15 – 17	20,7	25,8	31,0	62,0
18 ou mais	19,6	24,5	29,4	58,8

Fonte: WHO (2004).

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

De acordo com a recomendação da RNI uma dieta com biodisponibilidade de 5% deve ter uma ingestão 3 vezes maior que uma dieta cuja biodisponibilidade é 15%.

Apesar das informações mostradas na Tabela 4, sabe-se que na prática existe uma grande dificuldade de avaliar a biodisponibilidade do ferro presente nos alimentos. Essa questão é tão verídica, que em documento da OMS, é assumido que para países em desenvolvimento, seria mais realístico estimar uma biodisponibilidade de 5 a 10%.

De uma forma geral, a absorção do ferro presente na dieta é influenciada pela quantidade, forma química do ferro presente, pelo tipo de alimento consumido em uma mesma refeição, podendo conter fatores inibidores ou facilitadores da absorção do ferro, além do estado de saúde e estado nutricional de ferro do indivíduo. No caso de deficiência de ferro, o organismo aproveita melhor o ferro presente na dieta (BORTOLINI; FISBERG, 2010).

2.6 Diagnóstico e Tratamento da Deficiência de Ferro

A deficiência de ferro não pode ser diagnosticada pelos níveis de hemoglobina. Análises sanguíneas do teor de transferrina e ferritina, geralmente são necessárias para obter um diagnóstico.

A deficiência de ferro pode ser considerada anemia quando a hemoglobina está abaixo dos níveis normais estabelecidos, refletindo assim, a carência de um ou mais nutrientes necessários a sua maturação ou elaboração. Essa desordem nutricional é a forma mais grave de deficiência de ferro, se manifestando após a diminuição do ferro bioquímico e seus estoques depletados (WHO, 2001).

A concentração de hemoglobina é o mais confiável indicador de anemia para a maioria da população, pois a avaliação clínica é subjetiva, e pode apresentar margem de erro maior. A medição da concentração de hemoglobina é relativamente fácil e de baixo custo, e seu resultado é frequentemente utilizado como indicador para níveis de deficiência de ferro (WHO, 2008).

De acordo com a OMS, é considerado anemia quando a concentração de hemoglobina sanguínea apresenta níveis abaixo dos valores de referência citados a seguir: 13 g/dL para homens, 12 g/dL para crianças de 6 a 14 anos e mulheres (acima de 15 anos e não gestantes) e 11 g/dL para gestantes e crianças entre 6 meses e 6 anos (ARCANJO; AMANCIO; BRAGA, 2009).

O nível médio da concentração de hemoglobina pode ser mais baixo para populações onde a prevalência de hemoglobinopatias hereditária é alta. Nesse caso, a etiologia de anemia deve ser interpretada com cautela se o único indicador utilizado for a concentração de hemoglobina. Portanto, além dessa medida, é importante também identificar a causa da anemia, que pode variar de acordo com a população, e a partir destas informações buscar os tipos de medidas que podem ser feitas para prevenção e controle da anemia (WHO, 2008).

Dada a natureza multifatorial dessa doença, para o tratamento da anemia, recomenda-se uma abordagem integrada. De forma a combatê-la efetivamente, os fatores relacionados à anemia devem ser identificados e tratados (WHO, 2008). E a possibilidade de adoção de medidas preventivas em relação à anemia deve ser considerada, principalmente, porque se sabe que essa doença está associada à morbidade e mortalidade infantil. Além disso, existe um custo ao poder público e privado no tratamento e combate a essa carência (RIBEIRO; SIGULEM, 2008; SOUTO; BRASIL; TADDEI, 2008; ARCANJO; AMANCIO; BRAGA, 2009).

As estratégias atuais utilizadas na prevenção e tratamento de anemia ferropriva são: diversificação da dieta incluindo alimentos com melhor biodisponibilidade de ferro, suplementação medicamentosa e fortificação alimentar (SOUTO; BRASIL; TADDEI, 2008; ARCANJO; AMANCIO; BRAGA, 2009; VELLOZO; FISBERG, 2010).

Segundo Bortolini e Fisberg (2010) a melhor estratégia para repor os estoques depletados de ferro é a suplementação medicamentosa. E com o objetivo de melhorar os hábitos alimentares e evitar a recorrência da deficiência de ferro recomenda-se, a avaliação da ingestão alimentar e posterior orientação.

Em relação aos alimentos, a melhor abordagem para aumentar a ingestão de ferro do paciente é diversificar os alimentos e incluir alimentos fortificados na dieta.

Nos casos onde a deficiência de ferro não é a única causa da anemia, recomenda-se a intervenção de ferro em conjunto com outras medidas (WHO, 2008).

A diversificação alimentar está diretamente relacionada ao hábito alimentar, e também envolve aspectos como o acesso ao alimento, condição econômica para adquiri-lo, biodisponibilidade e aproveitamento do ferro ingerido. Dependendo da forma como este mineral é encontrado no alimento, pode ocorrer interação com fatores estimuladores e inibidores da sua absorção (VELLOZO; FISBERG, 2010).

Usualmente, nos casos onde a deficiência de ferro é a causa mais freqüente, para os grupos de risco, principalmente grávidas e crianças pequenas, a adição de ferro na dieta é feita através da suplementação utilizando sais de ferro (WHO, 2008).

Embora essa prática apresente algumas desvantagens como a necessidade de uso prolongado, dificuldade de acesso ao medicamento, distribuição inadequada pela rede de saúde, sabor metálico e pouco agradável, possibilidade de efeitos colaterais, tais como: escurecimento dos dentes, fezes e várias alterações gastrointestinais, como diarreia, vômito, náusea, flatulência e obstipação (VELLOZO; FISBERG, 2010).

Esses efeitos indesejáveis causados pelos sais de ferro, presentes na maioria dos medicamentos, levam a uma baixa adesão ao tratamento medicamentoso, restringindo assim a efetividade dessa estratégia (RIBEIRO; SIGULEM, 2008; JORDÃO; BERNARDI; FILHO, 2009; VELLOZO; FISBERG, 2010). Por outro lado, o sulfato ferroso constitui a fonte de ferro mais utilizada para tratamento de anemia devido ao baixo custo e elevada biodisponibilidade (MENDES, et al., 2008).

De modo geral os programas de prevenção e tratamento da anemia apresentam baixa adesão, isso acontece principalmente devido aos efeitos colaterais relacionados ao sistema gastrointestinal citado acima, resultantes da administração oral de compostos contendo ferro, em especial o sulfato ferroso. Dessa maneira, se faz necessário o desenvolvimento de novas estratégias, compostos ou sistema de liberação, que tenham alta biodisponibilidade do ferro e minimizem ou eliminem os efeitos colaterais (SAKAMOTO, 2003).

Segundo Olivares (2004), a suplementação profilática de ferro é um método útil que deve ser indicado caso a população de risco não tenha acesso a alimentos

fortificados, ou por um curto período de tempo, no caso de requerimentos nutricionais muito elevados. O autor sugere ainda que adotar medidas de motivação e educação adequadas, o emprego de doses de ferro mais baixas e a utilização de preparados de ferro que apresentam uma baixa incidência de efeitos adversos gastrointestinais, são estratégias que podem melhorar a efetividade dessa suplementação.

Na tentativa de minimizar os efeitos indesejáveis causados por medicamentos, novos compostos com ferro estão sendo desenvolvidos e utilizados no tratamento da anemia. Baseado nesse cenário, alguns estudos foram publicados utilizando ferro quelato como medicamento (comprimidos, soluções) e na fortificação de alimentos. Menor toxicidade e melhor tolerabilidade são citadas como as principais vantagens do quelato de ferro (LAYRISSE et al., 2000; RIBEIRO; SIGULEM, 2008).

2.7 Programas de combate a anemia

Inúmeros programas de combate à anemia têm sido proposto e realizados. O consenso geral é que as intervenções através destes programas são realizadas com competência, e o resultado é rentável e sustentável. No entanto, existe uma escassez de informações sobre o balanço dos programas governamentais para controle de deficiência de ferro, e os benefícios obtidos por estes programas no combate à anemia (WHO, 2008). De uma forma geral, pode-se constatar que o número de pessoas afetadas pela anemia é crescente, e proporcionalmente se mantém estável ao longo dos anos, conforme verificado na Tabela 1 (página 16).

Os compostos de ferro representam no máximo 7% do custo total dos programas de suplementação. Considerando que o custo dos demais componentes dos alimentos é baixo, a suplementação com ferro pode alcançar 27% do total do custo de produção, além do possível valor agregado relacionado ao marketing (WHO, 2008). Alguns alimentos enriquecidos com ferro são ofertados no mercado com alto custo, como por exemplo: *petit suisse* que custa em média R\$ 7,00, ou leite que custa em média R\$ 3,50.

Na avaliação da efetividade (relação custo benefício) de um programa de suplementação, a OMS considera que um programa é eficiente a curto e longo prazo quando atinge, respectivamente, 70 e 93% de efetividade. O caminho a ser seguido em programas de fortificação de alimentos está bem definido, talvez a maior dificuldade técnica seja encontrar uma combinação estável entre o composto de ferro com o alimento a ser fortificado (OLIVARES et al., 1997).

No Brasil, o Programa Nacional de Suplementação Medicamentosa de ferro aos grupos de risco, crianças de 6 a 18 meses, gestantes e mulheres pós-parto foi implantado a partir de 1998 (JORDÃO; BERNARDI; FILHO, 2009). A Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, que determinou, a partir de junho de 2004, que todas as farinhas de trigo e milho sejam adicionadas de ferro e ácido fólico, contendo no mínimo 4,2 mg de ferro e 150 µg de ácido fólico por 100g das farinhas (ANVISA, 2002).

Contudo, a suplementação da farinha de trigo, não leva em consideração a presença de fitatos (inibidor potencial da absorção de ferro não quelado). Os fitatos presentes em cereais como o trigo e feijão, e verduras como couve e aspargo são inibidores de absorção de ferro não-heme.

2.8 Fortificação dos alimentos

O processo de fortificação, enriquecimento ou adição, é aquele no qual se acrescenta ao alimento, um ou mais nutrientes, de acordo com os parâmetros legais, e com o objetivo de melhorar o valor nutritivo ou prevenir alguma deficiência nutricional na alimentação da população (ANVISA, 1998).

De acordo com a Anvisa (1998), para ser considerado fortificado/enriquecido, 100ml ou 100g do alimento pronto para o consumo deve fornecer em relação à IDR (Ingestão Diária Recomendada), mínimo de 15% do nutriente essencial para alimentos líquidos, e 30% para alimentos sólidos. E desta forma, podendo conter no rótulo a informação: “alto teor” ou “rico” (conforme regulamento técnico de informação complementar).

A fortificação dos alimentos foi instituída como recurso de combate às deficiências nutricionais em vários países da América do Sul e Central. Países como Costa Rica, Chile, México, Guatemala, Honduras, onde a efetivação das medidas relacionadas à fortificação, só ocorreu a partir de decisões políticas e incentivos do governo (VELLOZO; FISBERG, 2010).

Devido às alterações no padrão do consumo alimentar, aumento da ingestão de alimentos industrializados, e as perdas nutricionais durante o processamento e armazenamento dos alimentos, recomenda-se a adição de vitaminas e minerais aos alimentos processados, de modo a reduzir as deficiências nutricionais da população, principalmente a anemia ferropriva (VELLOZO; FISBERG, 2010).

De acordo com a Food and Agriculture Organization/ World Health Organization Standardization Food Program (1995) existe alguns princípios gerais que devem ser seguidos para a adição ou fortificação de nutrientes essenciais aos alimentos:

- Os nutrientes essenciais devem estar presentes em um nível que não irá resultar na ingestão excessiva ou insignificante do nutriente adicionado;
- A adição de um nutriente essencial para uma alimentação não deve resultar em um efeito adverso sobre o metabolismo de qualquer outro nutriente;
- Os nutrientes essenciais devem ser suficientemente estáveis nos alimentos, nas condições usuais de embalagem, armazenamento, distribuição e utilização;
- Os nutrientes essenciais devem ser biologicamente disponíveis no alimento;
- Os nutrientes essenciais não devem transmitir características indesejáveis ao alimento e não devem indevidamente encurtar a vida de prateleira;
- Tecnologia e instalações de processamento devem estar disponíveis para permitir a adição de nutrientes essenciais de forma satisfatória;
- A adição de nutrientes essenciais aos alimentos não deve ser usada para ludibriar o consumidor quanto ao valor nutricional dos alimentos;
- O custo adicional deve ser razoável para o consumidor a que se destina;

- Métodos de medição e controle dos níveis de nutrientes essenciais adicionados nos alimentos devem estar disponíveis;
- Devem ser previstos, em normas alimentares, regulamentos ou orientações para a adição de nutrientes essenciais aos alimentos, disposições específicas identificando os nutrientes essenciais a serem considerados, ou que sejam necessários, e os níveis em que eles devem estar presentes nos alimentos para alcançar sua finalidade.

Em documento, a Organização Mundial da Saúde (2006) reconhece quatro categorias de fortificação, são elas:

1. *Fortificação universal ou em massa*: consiste na adição de micronutrientes a alimentos consumidos pela maioria da população, geralmente de forma obrigatória. É indicado em regiões ou países onde vários grupos populacionais apresentam risco elevado para deficiência de ferro. É o caso da fortificação com ferro e ácido fólico das farinhas de trigo e milho aqui no Brasil.
2. *Fortificação em mercado aberto*: com a finalidade de agregar maior valor nutricional aos seus produtos, a indústria alimentícia faz esse tipo de fortificação. É o caso de produtos infantis, como petit suisse acrescido de ferro, ou achocolatado acrescido de ferro e cálcio.
3. *Fortificação focalizada ou direcionada*: direciona os alimentos enriquecidos para um grupo populacional de maior risco de deficiência, pode ser obrigatório ou voluntário. É onde se encaixa este estudo, pois o pão fortificado foi testado por crianças pré-escolares.
4. *Fortificação domiciliar comunitária*: normalmente acontece em países desenvolvidos e são adicionados suplementos às refeições, acontece de forma programada e é de fácil aceitação pelo público alvo, porém apresenta custo elevado e necessita de orientação. É o caso, por exemplo, de estudos de suplementação por meio de sachês de complexos vitamínicos.

A eficácia da fortificação de alimentos no combate a deficiência de ferro depende da seleção adequada do alimento a ser fortificado, pois ele deve fazer parte do hábito alimentar da população e abranger boa parte dela; oferecer o

produto de forma regular, mas sem excessos para evitar efeitos tóxicos; de forma a evitar rejeição, manter as características e aceitabilidade do alimento após a fortificação, e o mesmo deve apresentar baixo custo, de forma a facilitar a sua aquisição (SOUTO; BRASIL; TADDEI, 2008; VELLOZO; FISBERG, 2010).

Durante os últimos 50 anos, com o objetivo de prevenir a deficiência de ferro, muitos compostos de ferro têm sido testados na fortificação de alimentos. No entanto, esses compostos nem sempre atendem a todas as condições para a fortificação com ferro, considerando que o composto não deve mudar as características organolépticas do alimento e o produto final deve apresentar alta biodisponibilidade (LAYRISSE et al., 2000).

O grande desafio está relacionado à escolha da fonte de ferro para fortificar um produto alimentício, por tratar-se de um micronutriente que possui maior complexidade técnica. As formas de ferro melhor biodisponíveis são bastante reativas e tendem a causar alterações nas características organolépticas dos alimentos, como o sulfato ferroso, por exemplo, limitando assim, a quantidade de ferro a ser adicionada na fortificação (SOUTO; BRASIL; TADDEI, 2008; VELLOZO; FISBERG, 2010).

Os compostos protegidos, como quelatos de aminoácidos e compostos encapsulados, apresentam a vantagem de serem mais resistentes à influência do meio, diminuindo as interações com outros nutrientes e ingredientes, e possibilitam melhora na biodisponibilidade por apresentar melhor retenção do ferro no produto final (VELLOZO; FISBERG, 2010).

A partir da década de 70, as instituições internacionais da saúde (INACG, WHO) apontam a fortificação como a melhor estratégia para o combate permanente da anemia (COSTA et al., 2009). Desta forma, a fortificação de alimentos é considerada a abordagem mais prática no tratamento e prevenção da deficiência de ferro. Quando avaliada a médio e longo prazo apresenta a melhor relação custo-efetividade especialmente para crianças, onde as necessidades nutricionais são maiores (SOUTO; BRASIL; TADDEI, 2008; RIBEIRO; SIGULEM, 2008; ARCANJO, AMANCIO; BRAGA, 2009; VELLOZO; FISBERG, 2010).

Desta forma, um dos fatores importantes do alimento fortificado é a preservação do sabor e das características organolépticas (LAYRISSE et al., 2000). Infelizmente, problemas organolépticos, mudança de cor, ranço oxidativo e perda no sabor, são alguns dos possíveis efeitos indesejados apresentados por compostos de ferro (FOX; EAGLES; FAIRWEATHER-TAIT, 1997).

Nas duas últimas décadas, estudos nacionais mostraram sucesso no controle da anemia ferropriva em pré-escolares utilizando alimentos fortificados com ferro, sendo o ferro quelado um dos compostos mais empregados. Utilizando esses compostos, a prevalência de anemia reduziu de 21% para 12,6% no caso de pão fortificado, de 63,2% para 26,4% no caso do leite fluido fortificado e de 21% para 7% no caso de farinha de mandioca fortificada (TORRES, et al., 1996; TUMA et al., 2003; VELLOZO; SILVA; FAGIOLI, 2003; BAGNI et al., 2009).

No caso de fortificação no leite, por exemplo, o leite em pó é a melhor forma para adicionar sais de ferro, pois o leite *in natura* é rico em gordura e a lipoperoxidação pode ocorrer em algumas horas. Porém, o leite *in natura* é preferido em muitas áreas do mundo, como no Brasil e na Argentina, onde o leite em pó é pouco consumido. O quelato ferro-glicina é um fortificante que pode ser adicionado ao leite ou produtos derivados do leite sem causar peroxidação ou rancificação imediata (OLIVARES et al., 1997).

O pão é um alimento que vem sendo utilizado em estudos de enriquecimento com minerais e outros nutrientes, e por tratar-se de um alimento bastante difundido é uma das principais fontes calóricas de muitos países (VELLOZO; SILVA; FAGIOLI, 2003; NABESHIMA et al., 2005). Sendo assim, o pão além de ser um alimento de baixo custo, consumido diariamente por brasileiros de qualquer faixa etária, é um alimento integrante do cardápio da merenda escolar, servido a milhões de crianças em todo o Brasil, pode ser uma opção para enriquecimento com ferro.

A análise sensorial usa os testes quantitativos para avaliar a resposta de um grupo de pessoas, com o objetivo de determinar o grau de aceitabilidade global de um produto. É, portanto, uma das ferramentas mais utilizadas na avaliação da aceitabilidade de alimentos fortificados (CORREIA et al., 2007).

A escala hedônica é utilizada para testes afetivos, quando o objetivo é conhecer o “status afetivo” dos consumidores com relação ao produto testado (MORAES et al.,2008). Esses testes possibilitam a avaliação da aceitabilidade de alimentos mediante o seu real consumo, por meio de escala hedônica, utilizando fichas adequadas para a faixa etária analisada. Um dos principais critérios para a confiabilidade dos resultados é aplicar o teste na população alvo do produto (CORREIA et al., 2007).

Além disso, em relação à merenda escolar, a aceitação de alimento pelo aluno é o principal fator para determinar a qualidade do serviço prestado pelas escolas. Segundo normas do PNAE – Programa Nacional de Alimentação Escolar, as instituições de ensino deverão aplicar teste de aceitabilidade, sempre que ocorrer a introdução de um alimento diferente no cardápio. A metodologia a ser usada pode ser definida pela própria instituição de ensino, e deve seguir os parâmetros técnicos, científicos e sensoriais reconhecidos, porém o índice de aceitabilidade não deve ser inferior a 85%.

Conforme descrito existe estudos e políticas públicas com alimentos fortificados com ferro para a prevenção e tratamento da anemia ferropriva. No entanto, não foram encontradas publicações científicas detalhadas que envolvessem o processo de desenvolvimento do alimento fortificado com ferro, associado à avaliação da aceitabilidade por crianças em idade pré-escolar.

Neste estudo procuramos contemplar todas as etapas que envolvem o desenvolvimento do pão fortificado. O quelato peptídeo-ferro foi preparado exclusivamente para esta finalidade. Os equipamentos do laboratório de confeitaria e panificação da Universidade de Sorocaba foram utilizados para fabricação dos pães em escala piloto. O teste de aceitabilidade foi realizado com crianças em idade pré-escolar.

3. OBJETIVO

Preparar pães fortificados com ferro quelado a peptídeos da caseína e avaliar a sua aceitação em um grupo de crianças em idade pré-escolar

3.1 Objetivos específicos

- ✓ Definir o processo de fabricação dos pães em escala piloto;
- ✓ Quantificar o teor de ferro no quelato peptídeo-ferro; e nos pães fortificados;
- ✓ Caracterizar o quelato peptídeo-ferro;
- ✓ Aplicar o teste de aceitação dos pães fortificados e avaliar os resultados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matéria Prima

- Cloreto férrico (Marca: Reagen ultrapure chemicals do Brasil Ltda - Lote: 048k/09 - Validade: Nov/14)
- Hidrolisado de caseína (Marca: Fluka Analytical – Lote: BCBD4929V – Validade: 12/06/2016)

4.1.2 Equipamentos

- Batedeira Planetária (Marca: Amadio - Modelo: 20 LAM)
- Liquidificador (Marca: SKYMSEN - Modelo: LT – 1,5)
- Forno Combinado (Marca: Engefood (Rational) – Modelo: SCC61)
- Balança de Alimentos (Marca: Filizola – Modelo:MFI-6/1)
- Cilindro Industrial (Marca: G. Paniz – Modelo: MP 35)
- Estufa (Marca: Imeco - Modelo: -)
- Balança Analítica (Marca: OHAUS - Modelo: AS200S)
- Centrífuga de alimentos (Marca: Wallita – Modelo: RI 7771)
- Liofilizador (Marca: Thermo electron corporation - Modelo: drying digital unit modulyod – 115)
- Peagômetro (Marca: analyser - Modelo: 3035/99)
- Espectrofotômetro de Absorção Atômica (Marca: Shimadzu – Modelo: A680G)
- Calorímetro Exploratório Diferencial (Marca: Shimadzu – Modelo: DSC-50)
- Difratorômetro de RX (Marca: Siemens – Modelo: D5000)
- Infravermelho com transformada de Fourier (Marca: Shimadzu – Modelo: 8300)

4.2 Métodos

4.2.1- Preparação do quelato peptídeo-ferro

A preparação do quelato ferro peptídeo foi realizada conforme descrito por Chaud et al. (2002). A caseína hidrolisada foi dispersa (10% m/v), em água purificada por sistema miliQ, com agitação mecânica. O sistema caseína/água foi mantido sob agitação mecânica constante (1000 rpm) sob temperatura de 25-27°C durante 24h. Durante o período de agitação o pH do meio de dispersão foi corrigido, com NaOH 1,0 M, para 9,6. Após este período o FeCl₃ foi adicionado ao meio de dispersão (caseína/água) na proporção de 1:2 em relação à massa de caseína (FeCl₃:caseína).

O sistema (FeCl₃:caseína:água) foi mantido sob agitação constante, 500 rpm, 25-27°C, por 12 horas e em seguida mantida em repouso sob refrigeração por 24 horas. Após este tempo o pH foi registrado e o sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi ressuspenso por agitação em solução de HCl 0,1mM e deixado em repouso para decantação. Este procedimento foi repetido por três vezes, com um intervalo de 24h para decantação. A secagem do precipitado foi feito por liofilização. As amostras foram armazenadas em recipientes hermeticamente fechados, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

4.2.2 Caracterização do quelato peptídeo-ferro

A caracterização do quelato peptídeo-ferro foi realizada por meio de 3 métodos descritos a seguir: calorimetria exploratória-diferencial, espectroscopia por infravermelho e difração de raios-X.

4.2.2.1 Espectroscopia por infravermelho com Transformada de Fourier

O espectro de absorção no infravermelho foi obtido por meio de Transformada de Fourier usando método dos discos de brometo de potássio. As amostras de quelato e caseína foram misturadas com 375mg de brometo de potássio. A mistura foi comprimida por prensa hidráulica (8Kgf) durante 2 minutos para que discos com

10mm de diâmetro fossem obtidos. Os espectros foram obtidos na região entre 400 e 4000 cm^{-1} e comparados com o espectro do quelato peptídeo-ferro.

4.2.2.2 Difração por raio-X

Os estudos de difração de raios-X (DR-X) do quelato e hidrolisado de caseína foram realizados usando difrator de raio X, com níquel purificado e radiação de cobre. Todas as análises foram realizadas com a difração em ângulo de 2θ , variando de 5 a 70° graus.

4.2.2.3 Calorimetria exploratória diferencial

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi obtida na faixa de 25 a 350°C, sob atmosfera de nitrogênio, com razão de aquecimento de 10°C/min. e fluxo de 50mL/min. Todas as análises foram feitas utilizando cadinhos de alumínio contendo aproximadamente 1mg de amostras. O DSC do hidrolisado de caseína em pó foi comparado com o DSC do quelato peptídeo-ferro.

4.2.3 Testes para preparação dos pães fortificados

Sabe-se que o pão de leite é o pão mais oferecido na merenda escolar, desta forma, os testes, para desenvolvimento do pão fortificado com quelato peptídeo-ferro foram realizados tendo como base uma receita conhecida e testada de pão de leite tradicional.

Inicialmente a receita padrão foi proporcionalmente reduzida, de forma que os testes dos pães fortificados fossem adaptados para escala piloto. Baseado nessas quantidades devidamente calculadas os insumos a serem utilizados foram comprados em um hipermercado na cidade de Sorocaba, no dia anterior a realização do primeiro teste. Após a compra, os mesmos foram imediatamente transportados em veículo próprio dentro de sacolas plásticas até o laboratório de Apoio 3 da Uniso. Em seguida, os ingredientes foram devidamente armazenados no almoxarifado do laboratório, e os insumos refrigerados foram armazenados em câmara fria a temperatura de 10°C, e os demais foram armazenados em prateleiras de metal, conforme orientação da CVS-6/99 (ANVISA, 1999).

Os testes para fabricação dos pães fortificados foram realizados no laboratório de confeitaria, localizado no prédio Apoio 3 da Universidade de Sorocaba. No primeiro teste (receita I e receita II, Tabela 5) foram produzidas as receitas de pão de leite padrão e de pão de leite fortificado, para comparação dos sabores e avaliação de possíveis mudanças nas características organolépticas dos pães. A fortificação foi feita com a adição de 6g de quelato peptídeo-ferro, correspondente a 10% da quantidade de farinha de trigo utilizada na receita.

Para a preparação dos pães, todos os ingredientes foram separados e pesados em balança apropriada conforme as quantidades indicadas nas receitas (Tabela 5) e colocados em potes de inox, até o momento da mistura. Em seguida, a farinha de trigo, o leite em pó, o sal e o açúcar foram homogeneizados na batedeira planetária durante 2 minutos. Após esse período, foram acrescentados o reforçador (Pão Certo Fleischmann®) e o quelato peptídeo-ferro na massa do pão fortificado e misturados por mais 2 minutos. Por último, foram acrescentados margarina, ovos, fermento biológico e água gelada. A massa obtida da mistura acima foi batida na batedeira por mais 10 minutos ou, quando necessário, até atingir a textura caracterizada como correta. A massa foi retirada da batedeira, colocada sobre uma bancada revestida com aço inoxidável, sendo coberta e mantida em repouso por 20 minutos. Após esse período a massa foi pesada, e dividida em porções de 35g. Essas porções de massa foram passadas através de cilindro moldador para dar formato aos pães. Os pães foram colocados nas assadeiras previamente untadas com óleo comestível. Um espaço de aproximadamente 1 cm foi mantido entre os pães. As assadeiras foram colocadas no Forno combinado durante 40 minutos, para sofrer o processo de fermentação. Após esse tempo, os pães foram borrifados com água, e o Forno combinado foi programado para 150 °C durante 20 minutos. Após assados, os pães foram mantidos na estufa durante 1 hora para resfriamento, e em seguida pesados.

A receita III (Tabela 5) foi preparada da mesma forma das anteriores exceto pela quantidade de quelato adicionada, que neste caso foi de 9g. Às receitas IV e V (Tabela 5) foram adicionados 50g de cebola e mais 20g de farinha de trigo. A quantidade de quelato peptídeo ferro, para ambas as receitas, foram respectivamente 6 e 9g.

Tabela 5: Composição dos pães utilizados nas receitas dos pães de leite (I a III) e pães de leite temperado (IV e V)

Ingredientes	I	II	III	IV	V
Farinha de trigo	625g	625g	625g	645g	645g
Açúcar	75g	75g	75g	75g	75g
Sal	12,5g	12,5g	12,5g	12,5g	12,5g
Reforçador*	6g	6g	6g	6g	6g
Leite em pó	19g	19g	19g	19g	19g
Margarina	37,5g	37,5g	37,5g	37,5g	37,5g
Ovos	62,5g	62,5g	62,5g	62,5g	62,5g
Fermento biológico	47g	47g	47g	47g	47g
Água gelada	250ml	250ml	250ml	250ml	250ml
Quelato de ferro	-	6g	9g	6g	9g
Cebola	-	-	-	50g	50g

*Reforçador: é composto por amido, farinha de soja, levedura seca inativa, enzimas hemicelulase e lipase, emulsificante mono e diglicerídeos de ácidos graxos, melhorador de farinha alfa amilase, anti-oxidante glucose oxidase.

4.2.3.1 Preparação dos pães fortificados

As Figuras 1 e 2 apresentam a preparação da massa dos pães de leite e pães de leite temperado fortificados com quelato peptídeo-ferro.

Figura 1: Fluxograma ilustrado da preparação da massa do pão de leite fortificado com quelato peptídeo-ferro

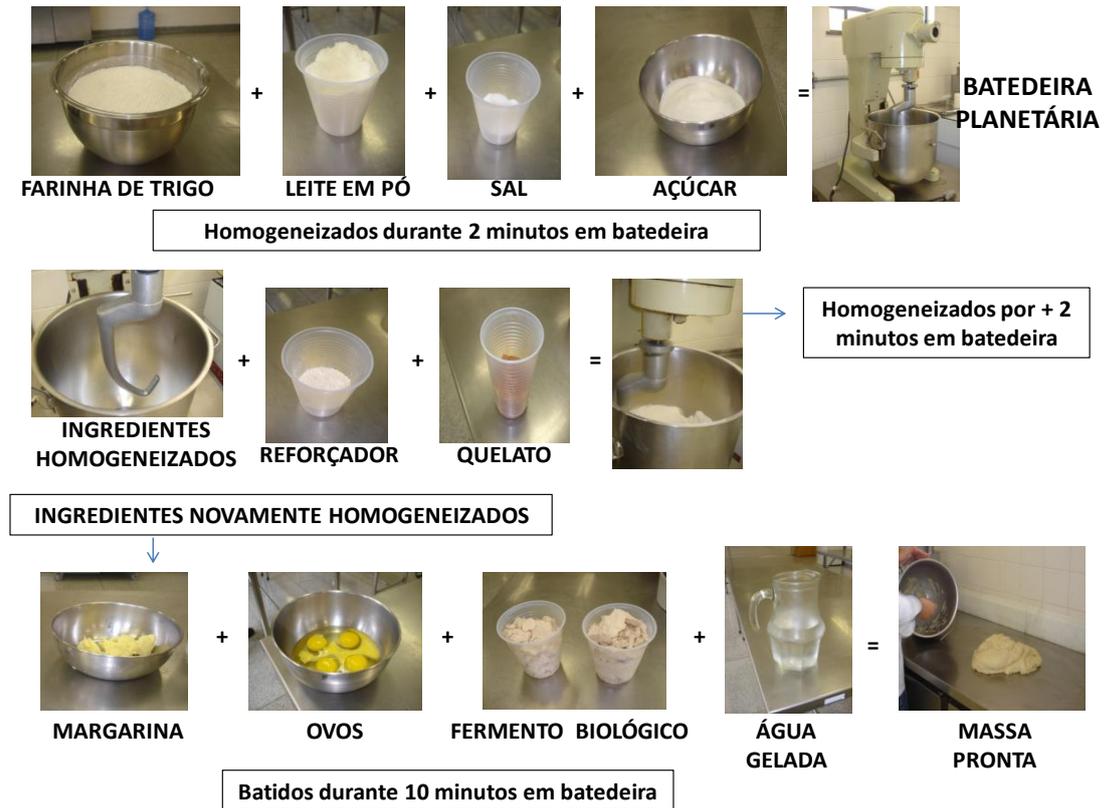
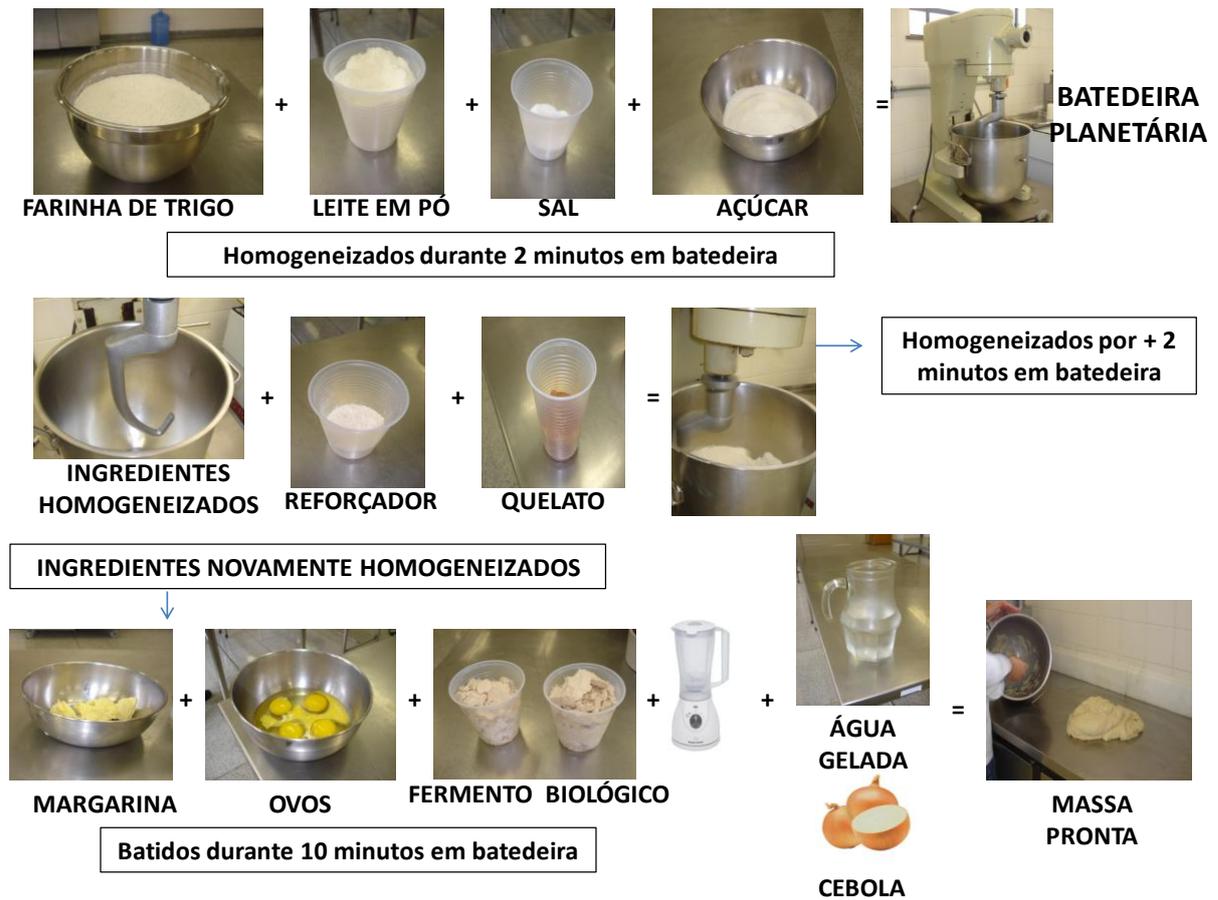
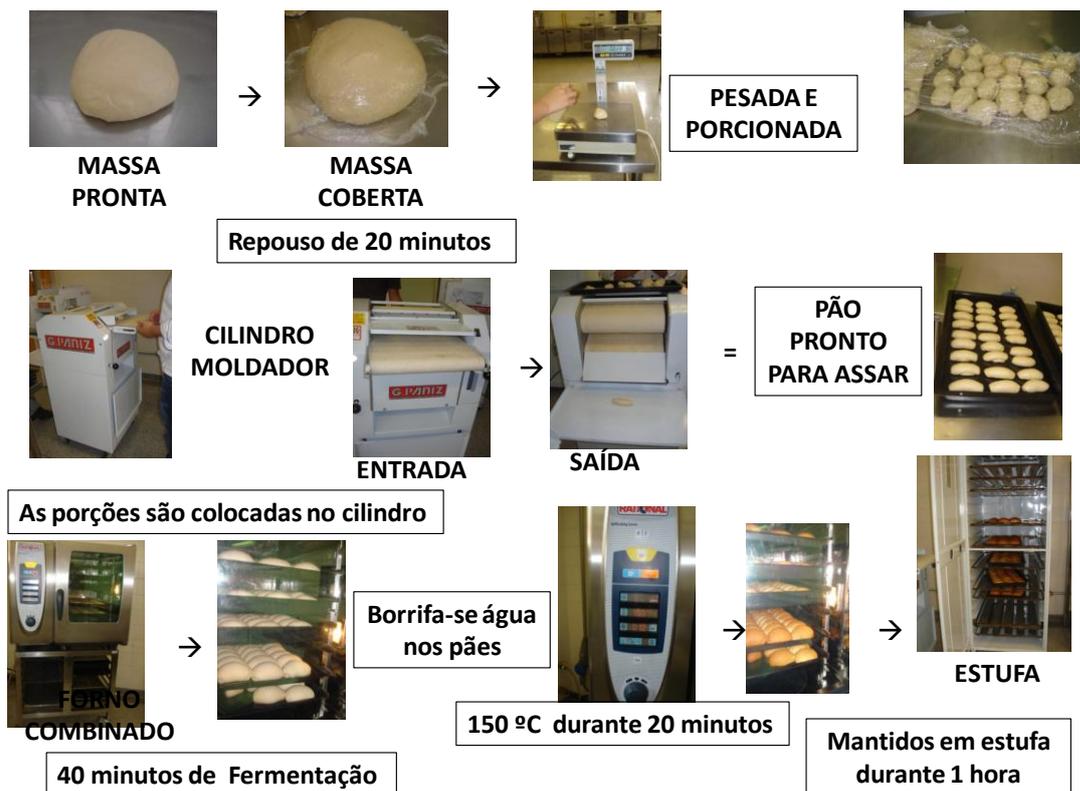


Figura 2: Fluxograma ilustrado da preparação da massa do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro



A Figura 3 apresenta o processo de fabricação dos pães de leite e pães de leite temperado e fortificados. Este processo está dividido em: repouso da massa, pesagem e porcionamento, moldagem, fermentação e assamento.

Figura 3: Fluxograma ilustrado do processo de fabricação dos pães fortificados



4.2.4 Determinação do valor nutricional dos pães fortificados

O valor nutricional dos pães fortificados foi calculado utilizando como base a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) produzida pela Unicamp.

O cálculo é feito baseado na fórmula a seguir:

$$Vn \text{ Pão} = \sum \frac{VnI \times M(g)}{100}$$

Onde, Vn é o valor nutricional, I é o ingrediente incluído na receita do pão e M é a massa em gramas do ingrediente.

4.2.5 Fluorescência de Raios X (FRX) para determinação do teor de ferro

Para determinação do teor de ferro no quelato e nas amostras de pães foi utilizada metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Resumidamente, o teor de ferro presente no quelato peptídeo-ferro e nos pães foi determinado por espectroscopia de fluorescência de raio-X. Cada amostra foi carbonizada em chama

de bico de Bunsen e, posteriormente, colocada na mufla (550°C) para incineração, por um período de aproximadamente 6 horas. Após esse tempo as amostras foram mantidas em dessecador até atingir o equilíbrio da temperatura com o meio ambiente. O peso das amostras foi registrado, e a média de $n=3$ calculada com o respectivo desvio padrão. O espectrômetro empregado foi um EDXRF (fluorescência de raios-X por dispersão de energia) Shimadzu EDX 700 - com tubo de Rh (voltagem aplicada de 50 kV) como fonte de raios-X e colimador do feixe de 10 mm. As celas foram preenchidas totalmente com as amostras, garantindo a absorção do feixe em modo de espessura infinita. As amostras de pão e quelato foram utilizadas na forma de cinzas.

4.3 População em estudo

O estudo foi desenvolvido na Escola Municipal de Educação Infantil (EMEI) Juvenal de Campos, em um bairro carente no município de Porto Feliz, no estado de São Paulo, em parceria com a Prefeitura Municipal. Segundo dados, a cidade de Porto Feliz tem uma população estimada em 51 mil habitantes, com uma área territorial de 557,9 km², e atende 6 mil crianças na merenda escolar (Prefeitura de Porto Feliz, acesso em 17/10/2010). A Secretaria de Saúde Municipal mantém um programa de reforço e qualificação alimentar das famílias (Pró-Quali), que mantém um histórico sobre as condições de saúde das crianças do EMEI.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Uniso (anexo A). Os pais e/ou responsáveis assinaram um termo de consentimento livre esclarecido para que tomassem ciência da pesquisa, e autorizassem a participação dos seus filhos (anexo B). Participaram da pesquisa 60 crianças entre 4 e 6 anos matriculadas na EMEI indicada pela prefeitura municipal.

4.4 Dados Estatísticos

Para calcular o tamanho da amostra foi considerado:

- identificação dos tipos de variáveis envolvidas no estudo relacionado às variáveis possíveis de serem encontradas:

- identificação do tipo de teste estatístico a ser adotado, levando em consideração a disponibilidade de uma fórmula exequível;

Grupo: Crianças em idade pré-escolar matriculadas na EMEI Juvenal de Campos

Variáveis qualitativas analisadas, segundo a escala hedônica:

- Detestei
- Não gostei
- Indiferente
- Gostei
- Adorei

A partir destas considerações o tamanho da amostra foi calculado fixando os níveis máximos de erro do tipo I ($\alpha = 0,05$) e do tipo II ($\beta = 0,2$), para diferença de 15% (0,15). Nestas condições o valor amostral (n) foi de 60 crianças.

4.5 Teste de aceitação

Inicialmente, realizou-se uma reunião com os pais das possíveis crianças participantes (60 crianças), onde foi explicado o objetivo da pesquisa e procedimentos adotados para a aplicação do teste de aceitação. Depois foi solicitado que os pais interessados em permitir que os filhos participassem da pesquisa, assinassem o termo de consentimento livre esclarecido.

Como critérios de exclusão foi considerado a presença manifestada pelos responsáveis, pela EMEI ou pela própria criança de intolerância alimentar a qualquer componente do pão fortificado e temperado e rejeição espontânea da criança em consumir o alimento.

Para o teste de aceitação foi utilizado o modelo de ficha de escala hedônica facial de cinco pontos sugerida pelo FNDE- Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação (<http://www.fnde.gov.br/> - pesquisa realizada em 20 outubro de 2011). Neste modelo, as crianças pintaram a expressão que melhor descrevesse o quanto gostaram de cada amostra de pão.

Foi realizado junto às crianças beneficiadas pela merenda escolar, o teste de aceitação de dois pães diferentes fortificados com quelato peptídeo-ferro. Os pães foram oferecidos às crianças em semanas diferentes evitando confundi-las em relação ao sabor.

Os pães fortificados foram servidos com margarina, no lanche da manhã, acompanhado por chá ou leite com achocolatado, de acordo com o cardápio do dia e rotina alimentar das crianças. Desta forma, foi possível avaliar a aceitação do pão como um alimento integrante da merenda escolar.

4.5.1 Preparação e armazenamento dos pães fortificados para realização do teste de aceitação

Os pães foram produzidos, um dia antes do teste de aceitação, de acordo com as receitas apresentadas na Tabela 5 e conforme ilustrados nas Figuras de 1-3. Após o resfriamento os pães foram contados e separados em sacos plásticos livres de contaminação, e armazenados à temperatura ambiente em local limpo e arejado, conforme orientação da CVS-6/99 (ANVISA, 1999).

No dia do teste, os pães foram transportados nos sacos plásticos, em veículo próprio da cidade de Sorocaba/SP até a cidade de Porto Feliz/SP. Ao chegar à EMEI, os pães foram levados até a cozinha da escola e os procedimentos para realização dos testes foram devidamente explicados às professoras e merendeiras.

4.5.2 Aplicação do teste de aceitação dos pães fortificados

Os testes de aceitação do pão de leite fortificado e do pão de leite temperado foram realizados com intervalo de sete dias. Os dois pães foram oferecidos com margarina, no período da manhã, entre 8 e 9hs, de acordo com o cardápio estabelecido pela nutricionista da EMEI.

O pão de leite fortificado foi servido com chá, e o pão de leite temperado fortificado foi servido com leite e achocolatado. Foi solicitado que a própria merendeira passasse margarina nos pães fortificados de forma a evitar outros fatores que pudessem influenciar na aceitação dos pães.

Por solicitação da nutricionista, os pães foram servidos nas salas de aula, de forma a evitar tumultos com as crianças das outras turmas não participantes do

teste. O horário de alimentação de cada turma foi respeitado, e a aplicação do teste iniciou na turma infantil IA, seguida pelas turmas infantil IIB e IIA.

A equipe responsável pela aplicação do teste foi apresentada às crianças e buscou interagir com elas de forma a deixá-las à vontade, criando um ambiente propício para a realização da atividade de degustação. As etapas de aplicação do teste foram devidamente explicadas para que o grau de satisfação fosse representado através da escala hedônica facial (anexo C). Após a explicação os pães foram servidos com margarina e seus acompanhamentos (chá ou leite com achocolatado). Enquanto as crianças lanchavam conforme o costume adotado pela escola, foi observado e anotado o consumo e repetição dos pães. A seguir foi solicitado que as mesmas preenchessem a ficha de escala hedônica facial de acordo com a sua percepção em relação a aceitação dos pães. Todas as crianças presentes e devidamente autorizadas participaram do teste e degustaram os pães fortificados.

5. Resultados e Discussão

5.1 Preparação do quelato peptídeo-ferro

A preparação do quelato peptídeo-ferro envolve três etapas: a primeira etapa é a determinação do ponto isoelétrico do hidrolisado de caseína que pode variar de acordo com os peptídeos presentes no composto. Freitas et al. (1993) e Chaud et al. (2002), identificaram o ponto isoelétrico entre os pH 7,5 e 7,8. Neste estudo o ponto isoelétrico foi encontrado no pH 9,6. No ponto isoelétrico a dispersão aquosa do hidrolisado de caseína fica totalmente límpida, indicando a obtenção de um estado de equilíbrio da solubilidade.

A diferença nos pontos isoelétricos pode estar relacionada com a origem do hidrolisado de caseína e conseqüentemente com o tamanho e quantidade de peptídeos presentes no produto. No ponto isoelétrico ocorre a solubilização total do hidrolisado de caseína e, conseqüentemente, a exposição dos grupos funcionais carboxilas (COO^-), por perda íon hidrogênio.

Na segunda etapa, a adição do FeCl_3 é realizada rapidamente para permitir coordenação do íon ferro (Fe^{3+}) às carboxilas aos peptídeos. Na incorporação do FeCl_3 o pH do meio diminui para cerca de 2,5 pela formação de ácido clorídrico (HCl). O hidrolisado de caseína precipita com o íon ferro coordenado nas carboxilas formando o quelato peptídeo-ferro. De acordo com Chaud et al.(2002) a formação de composto anelar justificaria o valor biológico do quelato peptídeo-ferro encontrado.

Na terceira etapa, o precipitado é, sucessivamente e exaustivamente, lavado com HCl 0,1mM para remover o ferro não quelado.

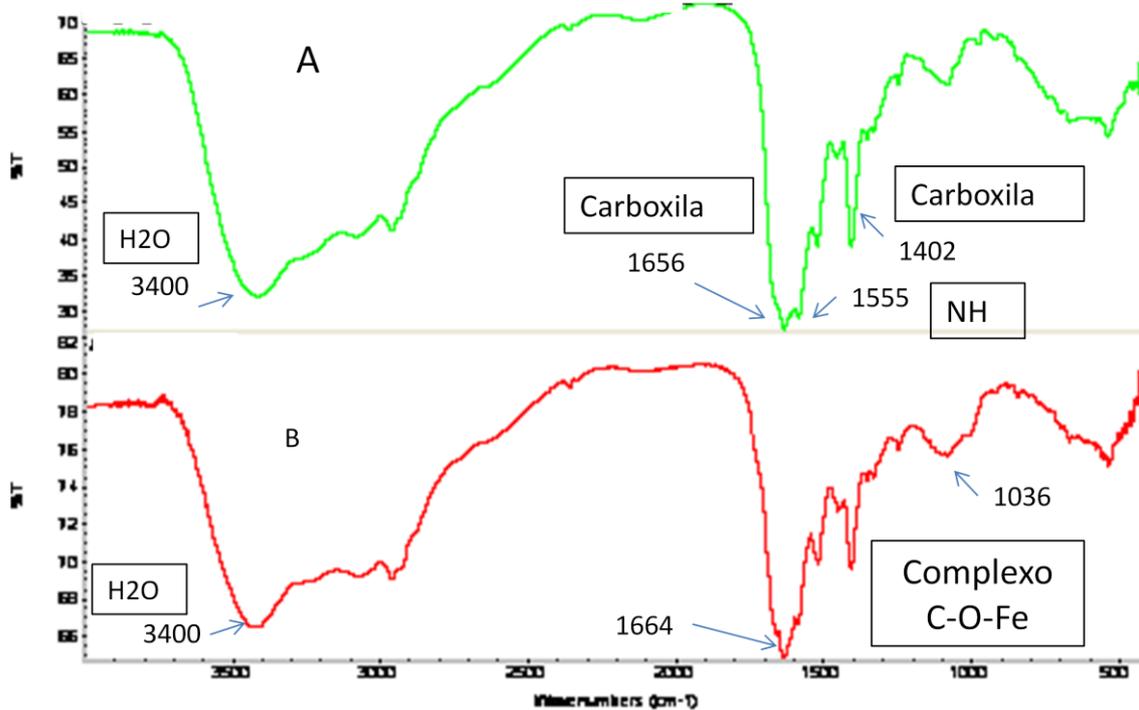
5.2 Caracterização do quelato peptídeo-ferro

5.2.1 Espectroscopia de infravermelho

A Figura 4 mostra os espectros de absorção do hidrolisado de caseína (espectro A) e do quelato peptídeo-ferro (espectro B). As principais contribuições no Painel A podem ser observadas nos comprimentos de onda de 1656cm^{-1} e 1402cm^{-1} relativos aos estiramentos do grupo COO, e 1555cm^{-1} referente a absorção das

ligações NH. Na região de maior frequência (3400cm^{-1}) a banda mais larga é referente à água de hidratação. No Painel B as maiores contribuições podem ser observadas na região 1664cm^{-1} e o aparecimento de uma banda na região de 1036cm^{-1} que pode ser atribuída ao complexo C-O-Fe (CHAUD, et al., 2002).

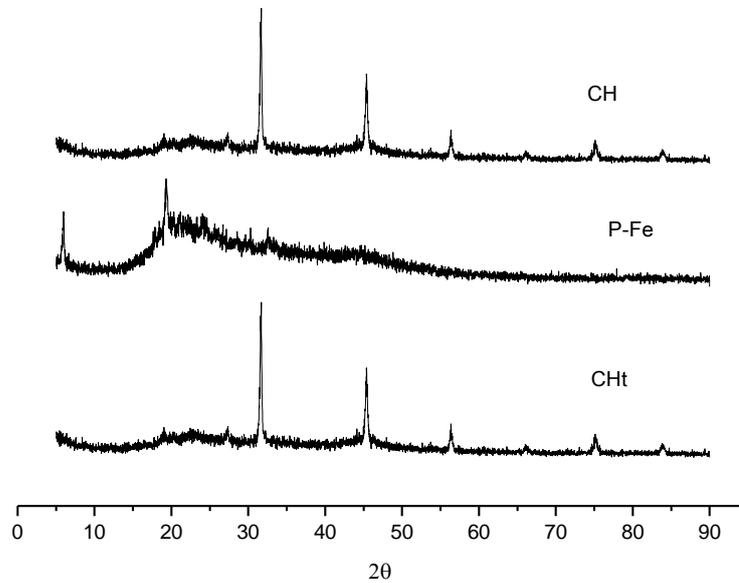
Figura 4: Espectroscopia por IVTF da caseína (A) e do quelato peptídeo-ferro (B)



5.2.2 Espectroscopia por difração de Raios X

O espectro de difração de raios X (Figura 5) do quelato peptídeo-ferro foi comparado com o espectro de difração de raios X da caseína pura. A caseína exibe picos ângulos de difração de 2θ para 32,15; 45,06; 56,1; 75,2; 84,05. Essas séries de picos indicam o estado cristalino da caseína. Embora não haja um padrão de referência para comparar o espectro, os picos estão, provavelmente, relacionados aos diferentes peptídeos resultante da hidrólise da caseína. O padrão de difração do quelato peptídeo-ferro reflete uma mudança na estrutura cristalina da caseína. Essa diferença pode estar relacionada a uma interação química entre os íons Fe e os peptídeos da caseína.

Figura 5: Espectros de difração de raios X da caseína hidrolisada (CH); quelato peptídeo ferro (P-Fe) e caseína hidrolisada tratada (CHt).

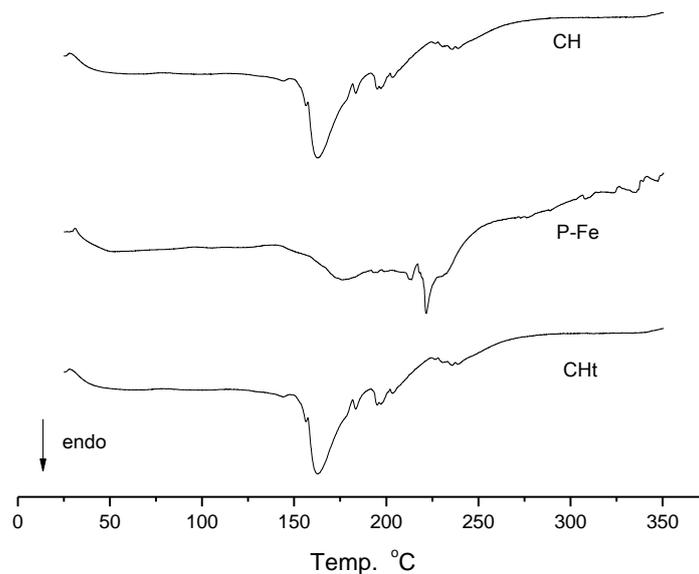


5.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial

Os espectros de calorimetria exploratória diferencial oferecem informações sobre, fusão, cristalização ou decomposição de material cristalino. Este estudo é útil para avaliar o estado físico-químico de matéria prima pura, bem como a interação entre compostos diferentes. O hidrolisado de caseína apresenta pelo menos 5 picos endotérmicos que corresponde, muito provavelmente, aos pontos de fusão dos peptídeos da caseína. Os pontos de fusão podem ser relacionados aos ângulos de absorção do espectro de difração. Se levarmos em consideração os tamanhos dos picos no espectro de difração e as energias gastas para fundir cada peptídeos do hidrolisado, o pico endotérmico em 156,7°C pode ser correlacionado com o pico cristalino em 32,15°. Uma vez que estas são as maiores áreas sob a curva, e estão relacionadas com a massa deste composto. Os demais picos em 180°C, 189,2°C, 191°C, 198,7°C corresponderiam, respectivamente, aos ângulos 45,06°, 56,06°, 75,2° e 84,05° do espectro de difração. O espectro calorimétrico do quelato peptídeo-ferro, mostra 2 picos endotérmicos principais o primeiro em 170°C e o segundo em 219,1°C e um pico secundário em 215°C. Mantendo a hipótese de

relação com os ângulos de difração de raios X, o pico endotérmico em 170°C e 219,1°C corresponderiam à 19° e 6°C. Por outro lado resultado da calorimetria exploratória confirma que há uma interação entre peptídeos da caseína e o íon Fe. Essa interação pode ser uma coordenação dos grupos amina ou carboxilas dos peptídeos com o íon Fe^{3+} formando o quelato peptídeo-ferro, como pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6: Espectros de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da caseína hidrolisada (CH); quelato peptídeo ferro (P-Fe) e caseína hidrolisada tratada (CHt).



5.3 Processo de fabricação dos pães fortificados

Durante o processo de preparação da massa, e principalmente nos momentos em que os pães estavam assando e ainda quentes, foi observado um forte odor de caseína. Vale ressaltar, que este odor ficou quase imperceptível após resfriamento dos pães.

Após cada teste de fabricação dos pães foi realizado uma degustação informal por funcionários e professores. No primeiro teste a grande maioria dos degustadores disseram que o pão de leite fortificado era tão saboroso quanto o pão de leite tradicional. Relataram também, ter percebido um sabor salgado mais acentuado no pão de leite fortificado, fato que pode ser justificado ao considerar a composição química do quelato peptídeo-ferro.

Outros testes foram realizados para o desenvolvimento de um pão de leite temperado, e visando adequar a quantidade de quelato peptídeo-ferro adicionada aos pães fortificados.

Desta forma, com base nos bons resultados alcançados nos testes, e na opinião dos degustadores a respeito dos pães, foram escolhidas as receitas III e V (Tabela 5) para realizar o teste de aceitabilidade junto às crianças.

5.4 Informações nutricionais dos pães

As informações nutricionais do pão de leite e do pão de leite temperado estão descritas na Tabela 6 (TACO, 2006).

Tabela 6: Informações nutricionais do pão de leite comercial (a), pão de leite fortificado (b) e pão de leite temperado fortificado (c) com quelato peptídeo-ferro

Unidade (25g)	Pão de leite	Pão de leite fortificado	Pão de leite temperado fortificado
Valor Calórico	76,2 kcal	71 kcal	70,8 kcal
Carboidrato	15,6 g	11,85g	11,86 g
Proteína	2,45 g	1,91g	1,91g
Gorduras Totais	0,47g	1,1g	1,1g
Fibra alimentar	0,05mg	0,06mg	0,07mg

Fonte: Taco (2006).

Nota: Dados trabalhados pelo autor.

De acordo com a Tabela 6, os valores nutricionais são semelhantes ao comparar o pão de leite comum, com o pão de leite e pão de leite temperado fortificado.

5.5 Fluorescência de Raios X

A Fluorescência de Raios X (FRX) é uma técnica de análise relacionada com a medida de energia e intensidade características da radiação X emitida por uma amostra irradiada com radiação eletromagnética, e foi utilizada para determinar o teor de ferro no quelato peptídeo-ferro e pães fortificados. A absorção de Raios X produz íons eletronicamente excitados que retornam ao estado fundamental por

transições que envolvem elétrons de níveis de energia mais alta. Neste processo de deslocamento há liberação de energia que pode ser utilizada na determinação qualitativa de um elemento, uma vez que ela é característica de cada elemento químico. A quantificação do elemento pode ser realizada pela intensidade da radiação emitida, uma vez que esta intensidade de radiação é proporcional à concentração da espécie (; SKOOG, et al., 2006; TERRA, et al., 2010).

A técnica de Fluorescência de Raios X dispensa procedimentos de preparo de amostra. Além disso, é uma análise não destrutiva, ou seja, a amostra não precisa ser inutilizada. Outras vantagens da fluorescência de raios-X são rapidez, baixo custo operacional, procedimentos limpos, sem consumo de reagentes ou geração de resíduos (TERRA, et al., 2010).

A Tabela 7 mostra o teor médio de ferro (ppm) em amostras da farinha utilizada para fabricação dos pães (F), no pão de leite sem quelato (PL), no pão de leite com quelato peptídeo ferro (PLQ) e no pão de leite temperado e com quelato peptídeo ferro (PCQ). Os resultados (exceto para o quelato peptídeo ferro) são representados também na Figura 7, .

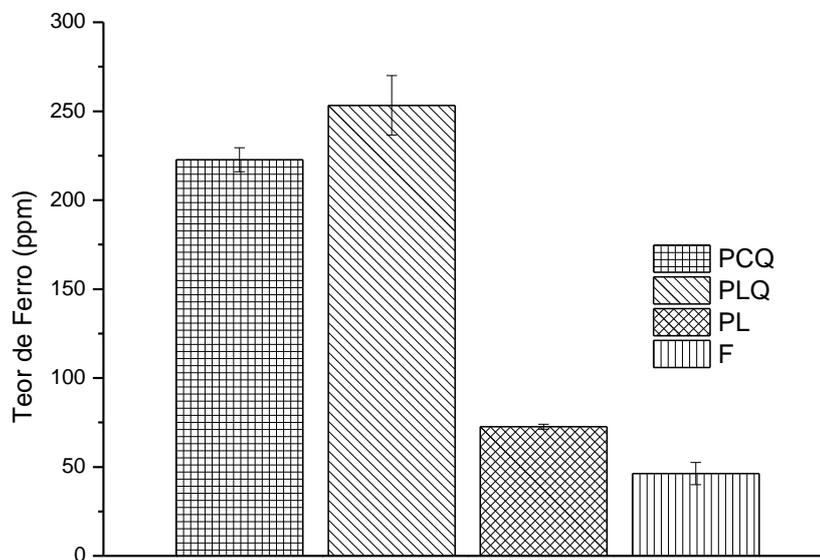
Tabela 7: Teor de ferro ($M \pm DP$) obtida por Fluorescência de Raio-X em amostras de quelato peptídeo ferro, pão de leite sem quelato peptídeo ferro, pão de leite e pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro (n=3).

Amostras	ppm de ferro ($M \pm DP$)	mg/g de amostra
Quelato peptídeo-ferro	12.249,86 \pm 36,7	12,249 \pm 0,036
Farinha (F)	46,29 \pm 6,2	0,0462 \pm 0,006
Pão de leite sem quelato (PL)	72,65 \pm 1,4	0,0726 \pm 0,001
Pão de leite (PLQ)(9g quelato/kg)	253,29 \pm 16,7	0,253 \pm 0,016
Pão de leite temperado (PLC) (9g quelato/kg)	222,74 \pm 6,7	0,222 \pm 0,006

Estes resultados mostram a média e o desvio padrão do teor de ferro no quelato peptídeo-ferro, na farinha, no pão de leite sem quelato peptídeo ferro, nos pães de leite fortificados com 9g de quelato peptídeo-ferro. O teor de ferro no quelato foi em média 12,24 mg/g este resultado é 2 vezes maior ao obtido por Chaud et al. (2002), e semelhante ao teor obtido por Chaud et al. (1999). O teor de ferro da farinha está de acordo com as normas brasileiras (RDC nº 344) de

enriquecimento das farinhas (ANVISA 2002). Considerando a perda diária de ferro, a dose de ingestão recomendada para crianças em idade pré-escolar, gestante, mulheres e homens adulto é, respectivamente, 15, 27, 18 e 8 mg de ferro/dia. A proporção contida na farinha como fonte para prevenção da deficiência de ferro é abaixo do necessário. Para os pães de leite enriquecidos com quelato peptídeo ferro a ingestão de 10 g de pão por dia seria suficiente para prevenir a deficiência de ferro em todas as faixas etárias. Considerando o valor biológico relativo do quelato peptídeo ferro (Chaud, et al., 2002). A ingestão superior a 10g poderia ser utilizada no combate à deficiência de ferro e anemia ferropriva.

Figura 7: Representação gráfica dos teores de ferro (\pm DP), no pão temperado (PCQ), no pão de leite com (PLQ) e sem quelato (PL) e na farinha utilizada para fabricação dos pães.



5.6 Teste de aceitação

O teste de preferência representa a somatória de todas as percepções sensoriais, e expressa o julgamento por parte do consumidor, sobre a qualidade do produto. Para determinar a preferência são empregados, geralmente, os seguintes testes: teste pareado, teste de ordenação e escala hedônica (MORAES et al., 2008).

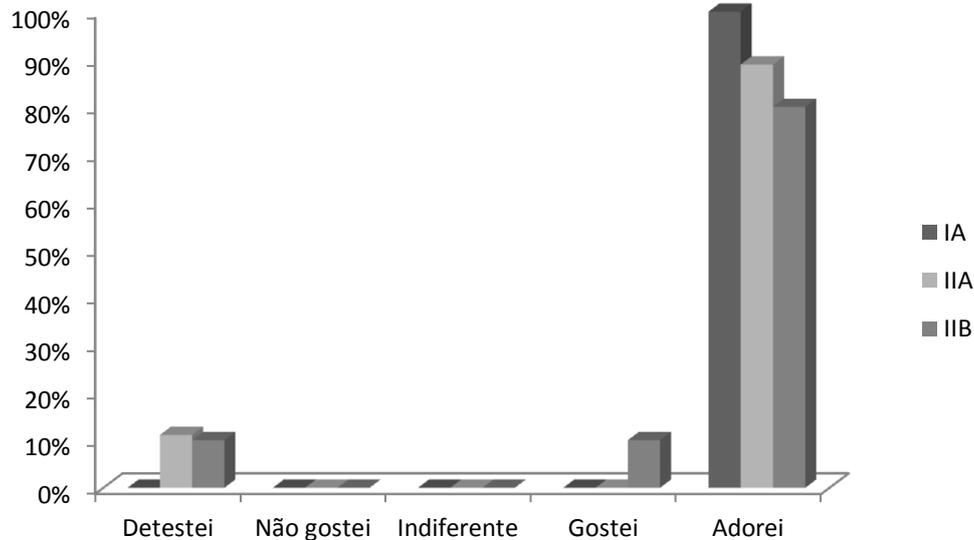
Para realização dos testes de aceitação foi utilizado a escala hedônica facial de cinco pontos. Esta ferramenta é utilizada em estudos de teste de aceitação nesta faixa etária, e por ser recomendada pelo Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação (FNDE), como instrumento de avaliação na merenda escolar (<http://www.fnde.gov.br/index.php/ae-alimentacao-e-nutricao>).

De acordo com Heisler (2008) que também utilizou a escala facial de cinco pontos em seu estudo, esse instrumento pareceu ser a escolha mais indicada para avaliar os pães enriquecidos com ferro, por tratar de crianças não alfabetizadas. Segundo Heisler, a escala hedônica está relacionada ao estado psicológico consciente agradável ou desagradável. E as respostas afetivas, são medidas por escala gradativa de pontos, previamente estabelecida, que no caso deste estudo, contemplou todas as possibilidades entre a não aceitação (detestei) e a plena aceitação (adorei).

O teste foi realizado em três turmas diferentes (Infantil IA, IIA e IIB) no mesmo dia e horário. Desta forma foi possível prevenir variáveis indesejadas, como: influência da professora, horário da refeição, tamanho da turma e grau de desenvolvimento das crianças. Antes da aplicação do teste, todas as crianças foram orientadas a escolher uma das cinco carinhas presentes na escala hedônica facial que melhor representasse o pão degustado. Durante a realização do teste foi possível perceber uma pequena diferença comportamental das professoras, e conseqüentemente nas crianças. As turmas Infantil IA e IIA contavam com professoras mais participativas que colaboraram com a explicação e incentivaram as crianças a participarem da atividade. Na turma Infantil IIB a professora, preferiu não intervir e deixou a sala no momento do teste. Embora o envolvimento das professoras fosse diferente não houve diferença entre o número de crianças que participaram do teste, que na totalidade estavam muito interessadas e foram bastante participativas.

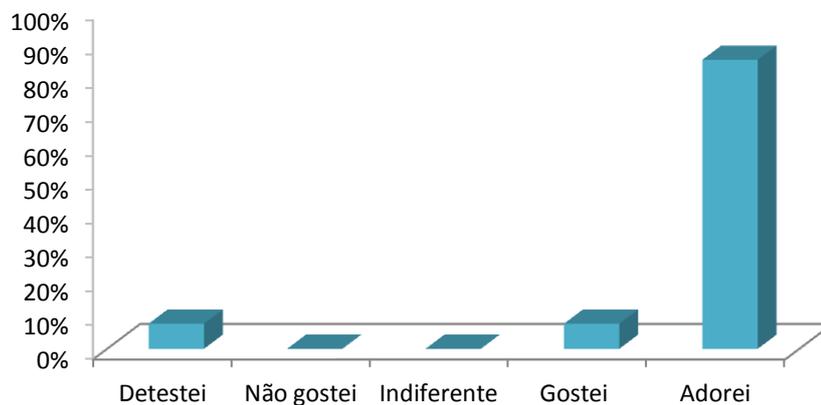
Os resultados da avaliação de aceitação, consumo alimentar e repetição do pão de leite são mostrados nas Figuras de 8 a 13, os mesmos estão apresentados em valores percentuais. A Figura 8 apresenta o percentual de aceitação das crianças ao pão de leite para cada uma das turmas.

Figura 8: Resultado da aceitação dos pães de leite fortificado com o quelato peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB



A Figura 9 apresenta a média do percentual de aceitação do pão de leite nas 3 turmas da EMEI Juvenal Campos (IA, IIA e IIB).

Figura 9: Média dos resultados da aceitação do pão de leite fortificado com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB)



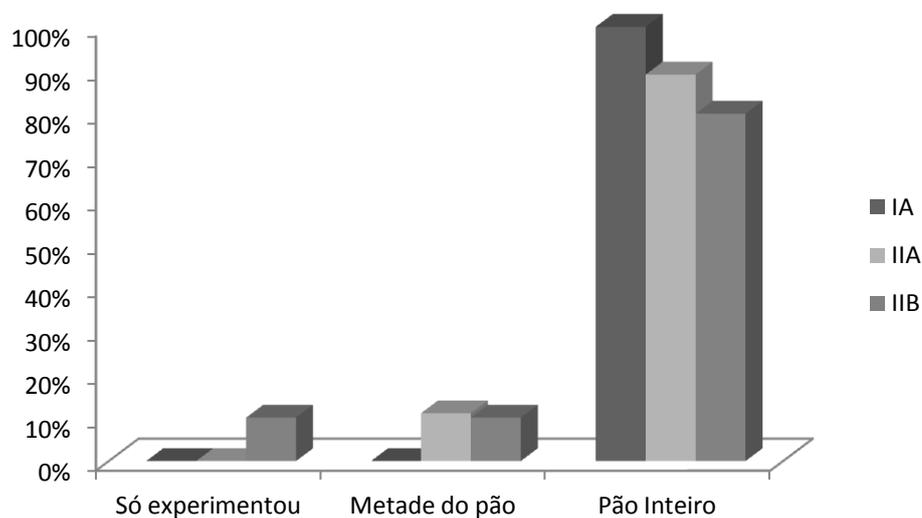
De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 8 e 9, aceitação do pão de leite fortificado com o quelato peptídeo-ferro foi considerada de alta relevância. Este fato fica evidenciado, principalmente, quando se analisa separadamente o resultado descrito pelas três turmas e se observa a homogeneidade das respostas. Ao analisar o resultado do teste de aceitação para cada turma (Figura 8), concluiu-

se que o pão de leite fortificado agradou a maioria absoluta das crianças nas três turmas IA (100%), IIA (89%) e IIB (80%).

Ao avaliar os resultados da escala hedônica facial somando os parâmetros “gostei” (10%) e “adorei” (80%), a aceitação também será de 90% para a turma Infantil IIB. Por esta análise o fato da professora ser mais ou menos participativa, não afetou significativamente os resultados, uma vez que iguala a rejeição “detestei” (10%) para as duas turmas IIA e IIB. Esta avaliação comparativa entre a aceitação e rejeição pode ser melhor analisada com os resultados apresentados na figura 9, onde temos 85,2% de “adorei”, 7,4% de “gostei” e 7,4% de “detestei”.

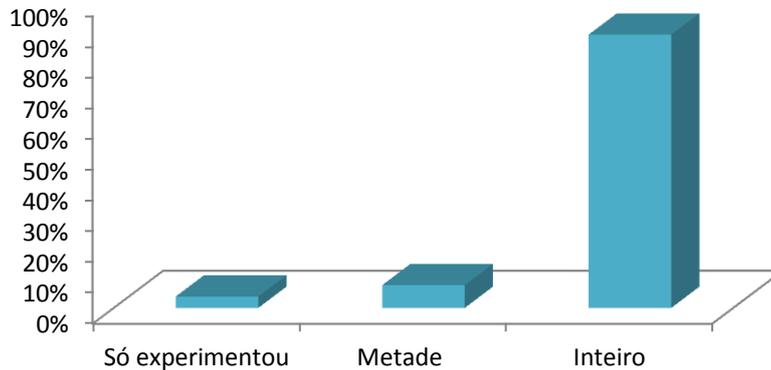
A Figura 10 apresenta o percentual de consumo alimentar do pão de leite fortificado em cada uma das turmas: IA, IIA e IIB.

Figura 10: Resultado de o consumo alimentar do pão de leite fortificado com o quelato de peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB



A Figura 11 apresenta o percentual de consumo alimentar do pão de leite nas 3 turmas (IA, IIA e IIB).

Figura 11: Média dos resultados do consumo alimentar do pão de leite fortificado com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB)



Nas figuras 10 e 11, pode-se observar que o consumo alimentar do pão de leite foi satisfatório e significativo. E ao analisar os resultados, separado por turma e no total, conclui-se que os mesmos reforçam os bons resultados apresentados no teste aceitação mostrados nas figuras 8 e 9.

Esse fato indica que as crianças provavelmente não escolheram a carinha “feliz” dentro da escala hedônica facial de forma aleatório ou por ser mais agradável, e sim que realmente gostaram e aprovaram o pão servido.

Ao avaliar os resultados de consumo alimentar do pão de leite apresentados na Figura 10, nota-se que o pão agradou a maioria absoluta das crianças, considerando que atingiu 100% na turma Infantil IA, 89% na turma Infantil IIA e 80% na turma Infantil IIB.

Apesar da turma Infantil IIB diferenciar-se um pouco das outras por apresentar 10% de crianças que só experimentaram o pão, e 10% de crianças que consumiram a metade do pão. Ao analisar a Figura 11, observa-se que esse fato não alterou de forma significativa o resultado total positivo do consumo, pois 88,9% das crianças ingeriram o pão inteiro, 7,4% das crianças ingeriram a metade do pão e apenas 3,7% só experimentaram o pão.

A Figura 12 apresenta o percentual de repetição do pão de leite fortificado em cada uma das turmas: IA, IIA e IIB. A Figura 13 apresenta a média percentual de repetição do pão de leite das 3 turmas (IA, IIA e IIB).

Figura 12: Resultado da repetição do pão de leite fortificado com quelato peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB

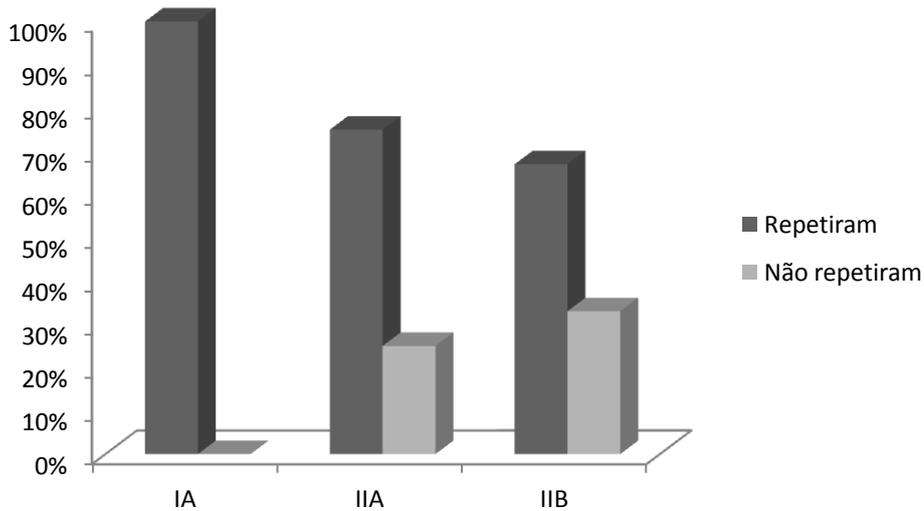
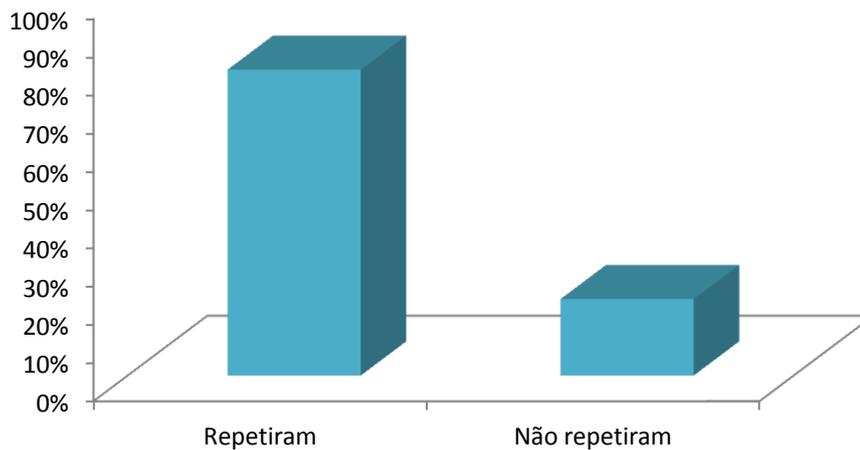


Figura 13: Média dos resultados da repetição do pão de leite fortificado com quelato peptídeo-ferro nas três turmas (IA, IIA e IIB)



Na Figura 12 observa-se que a turma infantil IA apresentou um ótimo resultado, atingindo 100% de repetição do pão de leite. E apesar do resultado não ter sido tão bom nas turmas Infantil IIA (75%), e Infantil IIB (67%), analisando os resultados da Figura 13, verifica-se que 80% do total de crianças repetiram, fato que confirma ainda mais os bons resultados apresentados no teste de aceitação e consumo alimentar do pão de leite.

Conforme descrito na metodologia, os testes do pão de leite e pão temperado foram aplicados em semanas diferentes. Os resultados da avaliação de aceitação,

consumo alimentar e repetição do pão de leite temperado são mostrados nas Figuras 14 a 19, e os mesmos estão apresentados em valores percentuais.

A Figura 14 apresenta o percentual de aceitação do pão de leite temperado em cada uma das turmas: IA, IIA e IIB. A Figura 15 apresenta a média do percentual de aceitação do pão de leite temperado nas 3 turmas (IA, IIA e IIB).

Figura 14: Resultado da aceitação do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB

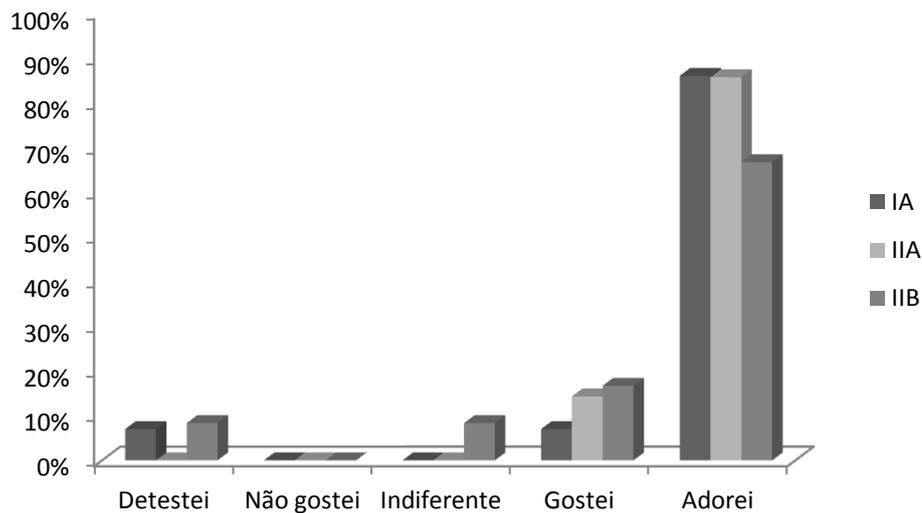
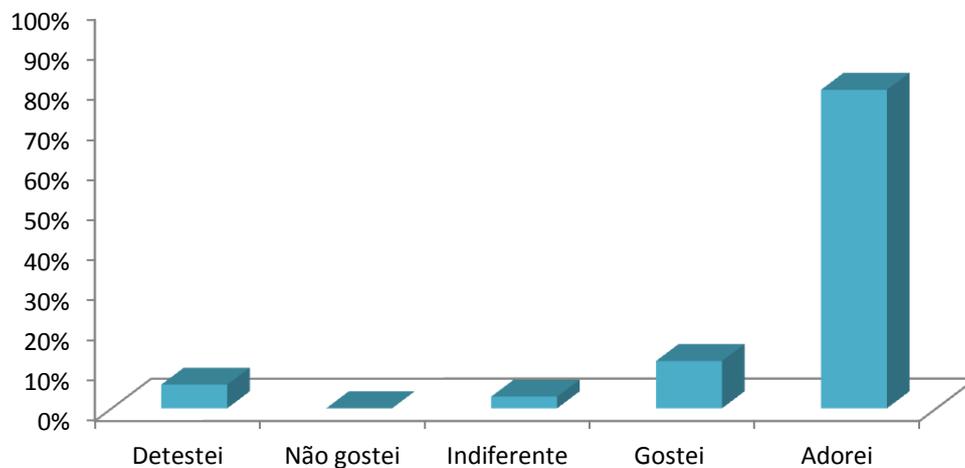


Figura 15: Média dos resultados do teste de aceitação do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB)



De acordo com as Figuras 14 e 15 verifica-se que o pão de leite temperado apresentou ótima aceitação pelas crianças. Ao analisar a Figura 14, verifica-se que a

turma Infantil IIA apresentou apenas resultados positivos, e que ao somar 86% de “adorei” e 14% de “gostei”, atinge-se 100% de aceitação. Nota-se que a turma Infantil IA apresentando 86% de “adorei” e 7% de “gostei” mostra melhor aceitação quando comparada a turma Infantil IIB, que apresentou 66,7% “adorei” e 16,7% de “gostei”, porém ao somar os dois pontos da escala hedônica facial (“adorei” e “gostei”) a diferença entre as duas turmas, torna-se menos significativa, sendo de 93% para a turma Infantil IA, e 83,4% para a turma Infantil IIB.

Observa-se também, que a rejeição foi semelhante nas turmas Infantil IA (7%) e IIB (8,3%), em relação ao percentual de crianças que escolheram “detestei” na escola hedônica facial. Vale ressaltar, que neste teste uma criança da turma Infantil IIB foi “indiferente” a aceitação do pão de leite temperado.

Na turma Infantil IIA estava presente uma criança deficiente auditiva que participou do teste com a colaboração da professora, através da linguagem dos sinais. A mesma escolheu a carinha “gostei” dentro da escola hedônica facial.

Na Figura 15, os parâmetros “detestei” (5,9%) e “indiferente” (2,9%) mostraram-se pouco significativos, pois ao analisar os resultados de um modo geral verifica-se uma excelente aceitação do pão de leite temperado de 91,2%, ao somar o percentual de “adorei” (79,4%) e “gostei” (11,8%), respondidos no teste de aceitação pelas crianças. Esse resultado indica que o fato do pão ser temperado com cebola não influenciou significativamente a aceitação das crianças, e que o mesmo poderia ser servido na merenda escolar como um importante instrumento na prevenção e tratamento de anemia ferropriva.

A Figura 16 apresenta o percentual de consumo alimentar do pão de leite temperado em cada turma: IA, IIA e IIB. A Figura 17 apresenta o percentual de consumo alimentar do pão de leite temperado nas 3 turmas (IA, IIA e IIB).

Figura 16: Resultado de o consumo alimentar do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB

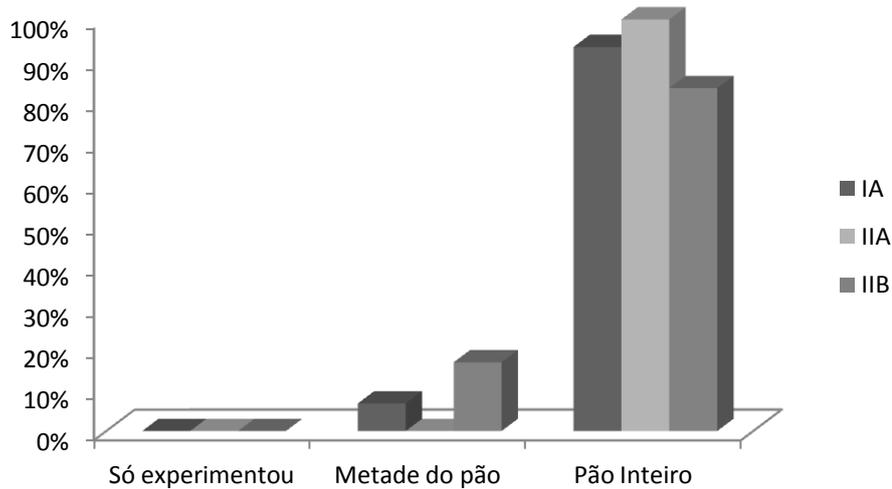
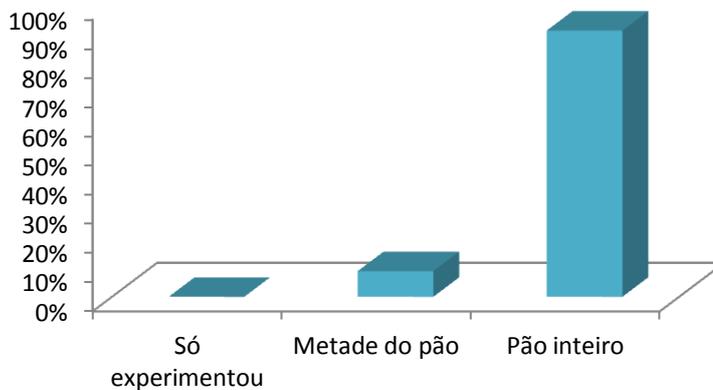


Figura 17: Média dos resultados do consumo alimentar do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB)



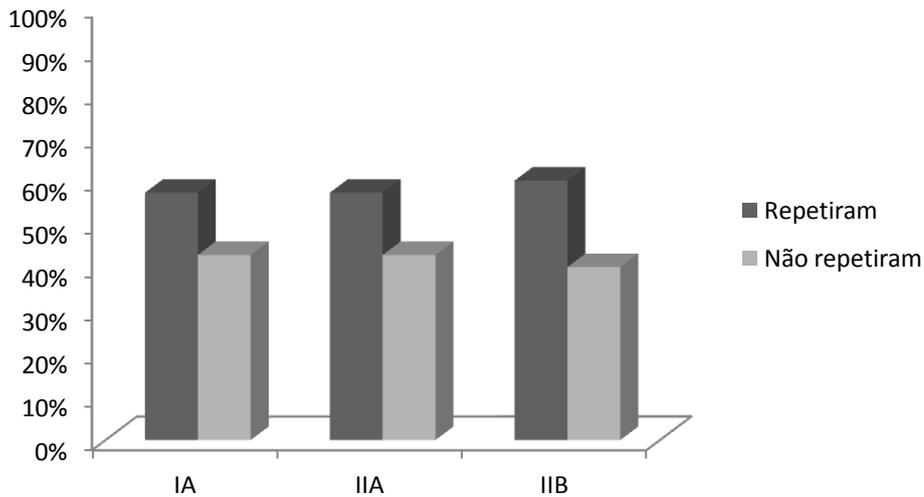
Na Figura 16, verifica-se um ótimo consumo alimentar do pão de leite temperado e indica que agradou a maioria absoluta das crianças, considerando o percentual de 100, 93 e 83%, das turmas IIA, IA e IIB, respectivamente. Ao analisar os resultados, conclui-se que o consumo alimentar confirma os bons resultados encontrados no teste de aceitação mostrado nas Figuras 14 e 15.

O fato do resultado do consumo alimentar ser satisfatório e corroborar com o resultado do teste de aceitação do pão temperado, mostra que é provável que as crianças tenham realmente gostado do pão e respondido o teste conforme orientação.

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram que todas as crianças que experimentaram o pão de leite temperado consumiram ao menos a metade do mesmo. E ao avaliar a Figura 17, observa-se que apenas 8,8% do total de crianças consumiram a metade do pão, e que a grande maioria 91,2%, consumiram o pão o inteiro.

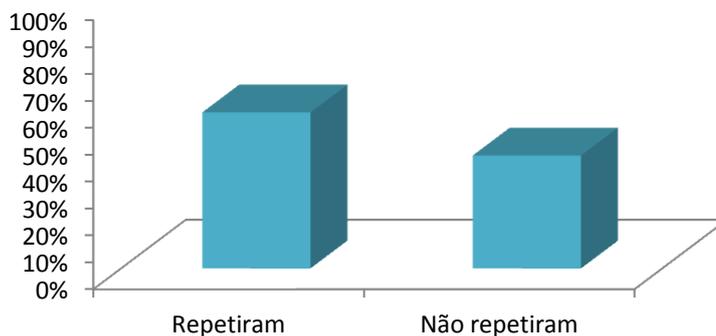
A Figura 18 apresenta o percentual de repetição do pão de leite temperado nas 3 turmas (IA, IIA e IIB).

Figura 18: Resultado da repetição do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro em cada turma: IA, IIA e IIB



A Figura 19 apresenta o percentual de aceitação do pão de leite temperado em todas as turmas (IA, IIA e IIB).

Figura 19: Média dos resultados da repetição do pão de leite temperado fortificado com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB)

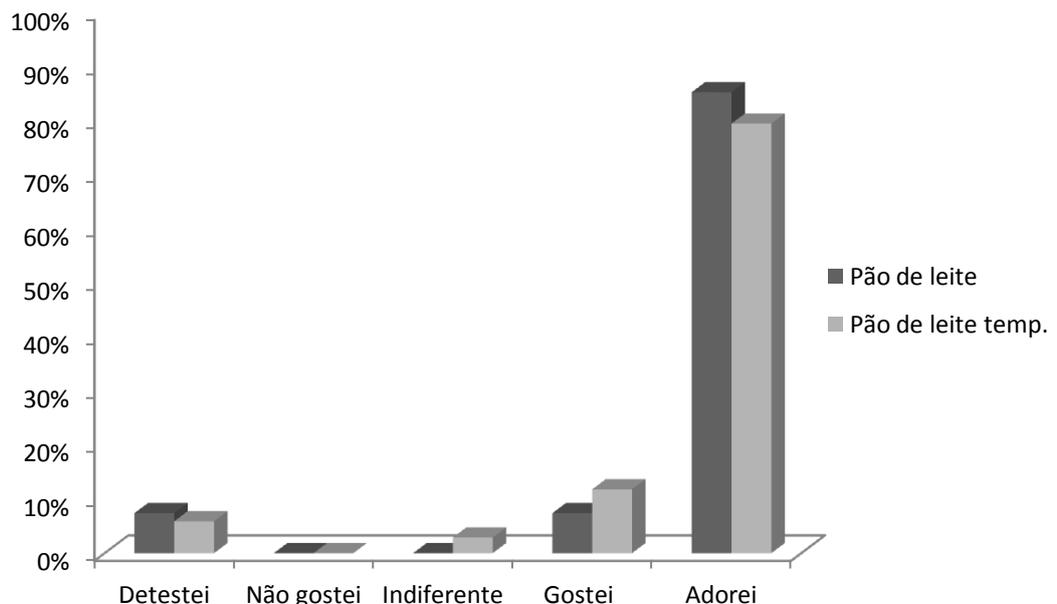


Ao analisar os resultados da Figura 18, observa-se que o percentual de repetição para o pão de leite temperado foi semelhante nas três turmas, considerando os valores a seguir: 57,2, 57,2 e 60%, turmas Infantil IA, IIA e IIB, respectivamente. Fato que se confirma, ao verificar a Figura 19, o percentual de 58% de repetição e 42% de não repetição para todas as crianças.

No processo de fabricação do pão de leite temperado, observou-se que o mesmo mostrava-se mais denso quando comparado ao pão de leite, fato que pode justificar o resultado mediano em relação à repetição. Portanto, apesar do pão de leite temperado apresentar ótimos resultados em relação à aceitação e consumo alimentar, pode não ter apresentado um resultado tão positivo quanto à repetição, por tratar-se de um pão mais denso e conseqüentemente mais saciável, gerando assim, a sensação de saciedade com um consumo menor.

A Figura 20 apresenta o percentual de aceitação do pão de leite comparado ao pão de leite temperado nas 3 turmas (IA, IIA e IIB).

Figura 20: Média dos resultados da aceitação do pão de leite e pão de leite temperado fortificados com quelato peptídeo-ferro nas três turmas (IA, IIA e IIB)



Ao comparar o resultado do teste de aceitação do pão de leite e do pão de leite temperado, observa-se na Figura 20, que a aceitação foi semelhante

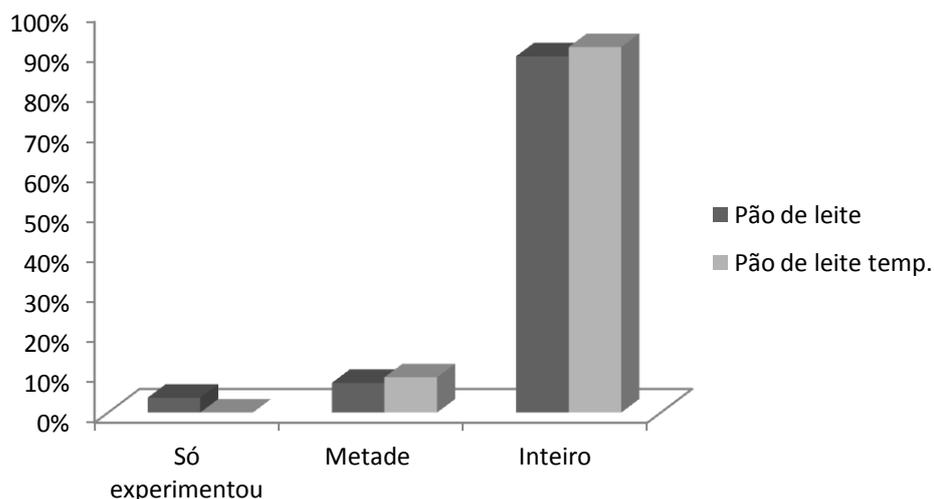
considerando que a soma dos parâmetros “adorei” e “gostei” do pão de leite e pão de leite temperado foram de 92,6 e 91,2%, respectivamente.

Em relação ao parâmetro “detestei” que representa a rejeição, também verificou-se essa semelhança, apresentando o percentual de 7,4% para o pão de leite, e 5,9% para o pão de leite temperado.

De acordo com os resultados mostrados acima, pode-se concluir que o pão de leite fortificado e o pão de leite temperado fortificado, atenderam as normas do PNAE, apresentando um índice de aceitabilidade superior a 85%, podendo assim, ser um alimento oferecido na merenda escolar.

A Figura 21 apresenta o percentual de consumo alimentar do pão de leite comparado ao pão de leite temperado em todas as turmas (IA, IIA e IIB).

Figura 21: Média dos resultados do consumo alimentar do pão de leite e pão de leite temperado fortificados com quelato peptideo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB)



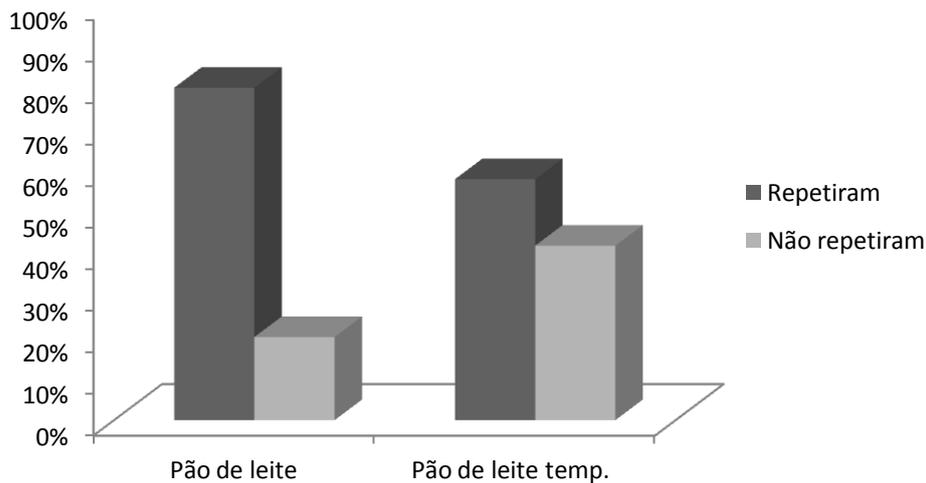
Ao analisar a Figura 21, nota-se que o consumo foi excelente para os dois tipos de pães, e que não houve diferença no consumo entre eles, considerando os percentuais de 88,9% para o pão de leite, e 91,2% para o pão de leite temperado. Pode-se concluir, portanto, que a cebola acrescida à receita do pão de leite não diminuiu a aceitação ou consumo pelas crianças.

O percentual de crianças que consumiram metade dos pães foi semelhante para o pão de leite (7,4%), e pão de leite temperado (8,8%). Baseado nos resultados

acima, conclui-se que o consumo do pão fortificado, sendo ele de leite ou de leite temperado foi significativamente elevado. Desta forma, sugere-se que os pães testados seriam ótimas opções de alimentos fortificados com ferro para serem oferecidos na merenda escolar.

A Figura 22 apresenta o percentual de repetição do pão de leite e pão de leite temperado em todas as turmas (IA, IIA e IIB).

Figura 22: Média dos resultados de repetição do pão de leite e pão de leite temperado fortificados com quelato peptídeo-ferro nas 3 turmas (IA, IIA e IIB)



Na Figura 22, observa-se que a repetição foi significativamente maior para o pão de leite (80%) quando comparado ao pão de leite temperado (58%). Esse resultado pode ser justificado ao considerar que o pão de leite temperado ficou mais encorpado, e apresentou maior saciedade quando comparado ao pão de leite.

Apesar de crianças em idade pré-escolar apresentarem resistência em experimentar e aceitar novos alimentos, os pães de leite fortificado tiveram um alto grau de aceitação pelas mesmas. Com base nos resultados deste estudo, podemos concluir que os pães de leite fortificados, com ferro quelado a peptídeos, apresentam-se como uma alternativa viável na solução do grave problema da anemia ferropriva em grupos de risco nutricional.

Além disso, o quelato de peptídeo-ferro é uma alternativa para enriquecimento de pães, com potencial para ser experimentado em outros produtos de panificação. O custo financeiro para produção laboratorial de 1,1 Kg de quelato peptídeo ferro é

inferior a R\$ 170,00. Considerando que são utilizados 9g de quelato peptídeo ferro por cada 1,0 Kg de massa de pão, o quelato representaria um custo de R\$ 0,046 por pão fortificado. A receita de pão fortificado representaria um custo de R\$ 2,56, o que significa que cada unidade de pão custaria em média R\$ 0,13, ao somar o valor de R\$ 0,085 referente ao custo do pão, ao com valor de R\$ 0,046 referente ao custo do quelato. Portanto, um valor econômico plenamente acessível à população.

6. CONCLUSÃO

O resultado do estudo por espectroscopia de infravermelho, difração de raios X e DSC mostrou que o elemento ferro está quelado ao peptídeo.

A técnica de fluorescência de raios X permitiu quantificar o teor de ferro no quelato e nos pães.

Os pães fortificados com ferro quelado a peptídeos da caseína foram obtidos em escala piloto e esta tecnologia está pronta para ser transferida para panificadoras públicas ou privadas.

O teor de ferro quelado e presente nos pães não alteraram de forma significativa as características organolépticas do produto.

A aceitação do pão fortificado pelas crianças foi plenamente satisfatória, indicando que este produto poderia ser incluído na merenda escolar para crianças nesta faixa etária.

O enriquecimento dos pães aumenta o valor nutricional deste alimento podendo minimizar os graves problemas de saúde pública causada pela deficiência de ferro ou pela anemia ferropriva.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.A.N., et al.. Fatores associados a anemia por deficiência de ferro em crianças pré-escolares brasileiras. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.80, n.3, p.229-234, 2004.
- AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S.M.A.; PADOVANI, R.M; DRI: síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n.1, p.71-78, jan./abr. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v14n1/7574.pdf>>. Acesso em: 10/04/2012.
- ARCANJO, F.P.N.; AMANCIO; O.M.S.; BRAGA; J.A.P. Fortificação alimentar com ferro. **O mundo da saúde**, São Paulo, v.33, n.3, p.279-285, 2009.
- ASSUNÇÃO, M.C.F., et al.. Anemia em menores de seis anos: estudo de base populacional em Pelotas, RS. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.41, n.3, p.328-335, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/nahead/5856.pdf>>. Acesso em: 12/01/2012.
- BAGNI, U.V., et al. Efeito da fortificação semanal do arroz com ferro quelato sobre a frequência de anemia e concentração de hemoglobina em crianças de creches municipais do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, n.2, p.291-302, fev. 2009.
- BERNARDI, J.R., et al. Consumo alimentar de micronutrientes entre pré-escolares no domicílio e em escolas de educação infantil do município de Caxias do Sul (RS). **Revista de Nutrição**, v.24, n.2, p.253-261, mar./abr. 2011.
- BORTOLINI, G.A., FISBERG, M. Orientação nutricional do paciente com deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n.2, p.105-113, 2010.
- BOTH, I.W., AUKETT, M.A. Iron deficiency anaemia in infancy and early childhood. **Archives of Disease in Childhood**, v.76, p.549-554, 1997. Disponível em: <<http://adc.bmj.com/content/76/6/549.full.pdf+html>>. Acesso em: 10/04/2012.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. Portaria nº31. Aprova regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília (DF); 13 de janeiro de 1998.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. Portaria CVS-6/99. Aprova regulamento técnico que estabelece os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília (DF); 10 de março de 1999.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC nº344. Farinha terá ácido fólico para combater anencefalia em bebês. **Diário Oficial da União**, Brasília (DF), 13 de dezembro de 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2002/120602.htm>>. Acesso em: 15/09/2010.

BRIGGS, M., SAFALI, S., BEALL, D.L. American Dietetic Association Society for Nutrition Education; American School Food Service Association. Position of the American Dietetic Association: Local support for nutrition integrity in schools. **Journal American Dietetic Association**, v.103, n.4, p.505-14, Apr., 2003.

BUENO, M.B., et al.. Prevalência e fatores associados à anemia entre crianças atendidas em creches públicas em São Paulo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.9, n.4, p.462-470, 2006.

CHAUD, M.V. et al. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.50, n.4, p.871-877, 2002

CHILDS, F., et al. Dietary education and iron deficiency anaemia in the inner city. **Archives of Disease in Childhood**, v.76, p.144-147, 1997. Disponível em: <<http://adc.bmj.com/content/76/2/144.full.pdf+html>>. Acesso em: 10/04/2012.

CORREIA, C. B. L. et al. Teste de aceitação de brigadeiro de feijão. **X jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX 2010**, Recife, 18 de outubro de 2010.

COSTA, C. A., et al. Anemia em pré-escolares atendidos em creche de São Paulo (SP): perspectivas decorrentes da fortificação das farinhas de trigo e milho. **J. Brazilian Society of Food and Nutrition**, São Paulo, v.34, n.1, p.59-74, abr. 2009.

FUNDO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO. Manual para aplicação dos testes de aceitabilidade no PNAE, **Cecane**, Unifesp, 2010. Disponível em: <<http://www.fnnde.gov.br/index.php/ae-alimentacao-e-nutricao>>. Acesso em: 10/08/2011.

FOX, T.; EAGLES, J.; FAIRWEATHER-TAIAT, JS. Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant food. **The American Journal of Clinical. Nutrition**, v.67, n.4, p.664-8, 1998. Disponível em: <http://www.ajcn.org/content/67/4/664>. Acesso em: 19/01/2012.

FREITAS, O. et al. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. **Journal of. Agricultural and. Food Chemical**, v.41, p.1432-1438, 1993.

HATIPOGLU, H., et al. Severe periodontal destruction in a patient with advanced anemia: A case report. **European Journal of Dentistry**, v.6, p.95-100, jan., 2012.

HEISLER, G.E.R. et al. Viabilidade da substituição da farinha de trigo pela farinha de trigo de arroz na merenda escolar. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.3, p.299-306, jul./set., 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos., 3ª ed. São Paulo: Int. Adolfo Lutz, v.1, 1985.

JORDÃO, R.E.; BERNARDI, J.L.; FILHO, A.A.B. Prevalência de anemia ferropriva no Brasil: uma revisão sistemática. **Revista Paulista de Pediatria**, v.27,n.1, p.90-8, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rpp/v27n1/14.pdf>>. Acesso em: 10/01/2012.

- LAYRISSE, M. et al. Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bis-glycine chelate, phytates and polyphenols. **The Journal. Of Nutrition**, v.130, n.12, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958812>>. Acesso em: 19/01/2012.
- MACHADO, E.H., et al.. Condição nutricional e prevalência de anemia em crianças matriculadas em creches beneficentes. **Revista Paulista de Pediatria**, v.23, n.1, p.21-26, 2005.
- MATTA, I.E.A., et al.. Anemia em crianças menores de cinco anos que freqüentam creches públicas do município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 5, n.3, p.349-357, 2005.
- MENDES, F.Q., et al. Formulação de leite em pó enriquecimento com ferro. **B. CEPPA**. Curitiba, v.26, n.1, p.93-100, jan./jun., 2008.
- MIRANDA, A. S., et al.. Anemia ferropriva e estado nutricional de crianças com idade de 12 a 60 meses do município de Viçosa, MG. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.16, n.2, p.163-169, 2003.
- MONTEIRO, C.A., SZARFARC, S.C., MONDINI, L. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.6, p.62-72, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v34n6s0/3519.pdf>>. Acesso em: 06/10/2010
- MORAES, A.C.S., CID, L.L., OLIVEIRA, I.N., RODRIGUES, M.C.P. Avaliação comparativa de resultados de testes sensoriais com escalas e testes de ordenação preferência com crianças e adultos. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.2, n.1, p.104-115, 2008.
- MUNIZ, P.T. et al.. Child health and nutrition in the Western Brazilian Amazon: population-based surveys in two countries in Acre State. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, n.6, p.1283-1293, 2007.
- NABESHIMA, E.H., et al. Propriedades tecnológicas e sensoriais de pães fortificados com ferro. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.3, p.506-511, jul./set. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n3/27019.pdf>>. Acesso em: 06/10/2010
- NORTON, R.C., et al.. Prevalence of anemia among school-children from Rio Acima (State of Minas Gerais, Brazil): use of the standardized prevalence method and evaluation of iron deficiency. **Brazilian Journal. Med. Biol., Res.** v.29, n.12, p.1617-24, dez., 1996.
- OLIVARES, M. et al. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. **Journal of Nutrition**, v.127, n.7, p.1407-11, Jul. 1997.
- OLIVARES G, Manuel. SUPLEMENTACIÓN CON HIERRO. **Revista Chilena de Nutrición**, Santiago, v.31, n.3, dic. 2004.

- OSORIO, M.M. Fatores determinantes da anemia em crianças. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.78, n.4, p.269-278, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jped/v78n4/v78n4a05.pdf>>. Acesso em: 14/01/2012.
- PNDS – Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher. Anemia e Hipovitaminose A. Brasil, 2009. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/pnds/anemia.php>>. Acesso em: 20/03/2012.
- REZENDE, E.G., SANTOS, M. A., LAMOUNIER, J.A., GALVÃO, M.A.M., LEITE, R.C. Deficiência de ferro e anemia em escolares da área rural de Novo Cruzeiro (Minas Gerais) Brasil. **Revista de Medicina**, Minas Gerais, v.19, n.2, p.103-108, 2009. Disponível em: <<http://www.medicina.ufmg.br/rmmq/index.php/rmmq/article/viewFile/109/90>>. Acesso em: 03/10/2010.
- RIBEIRO, L.C., SIGULEM, D.M. Tratamento a anemia ferropriva com ferro quelato glicinato e crescimento de crianças na primeira infância. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.21, n.5, p.483-490, set./out., 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v21n5/a01v21n5.pdf>>. Acesso em: 03/10/2010.
- SANTANA, M.A.P., NORTON, R.C., FERNANDES, R.A.F. Deficiência de ferro: ainda a principal etiologia entre crianças encaminhadas por motivo de anemia para serviços especializado de hematologia. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v.9, n.3, p.311-318, jul./set, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbsmi/v9n3/10.pdf>>. Acesso em: 06/10/2010.
- SAKAMOTO, L.M. Estudo comparativo entre os aumentos das ferremias, determinados sem a administração prévia do ferro; após as administrações de sulfato ferroso, e complexo ferro-peptídeo. **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, 2003.
- SKOOG, D.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**, 5^a ed. São Paulo: Bookman, 2006.
- SOUTO, T.S., BRASIL, A.L.D., TADDEI, J.A.A.C. Aceitabilidade de pão fortificado com ferro microencapsulado por crianças de creches das regiões sul e leste da cidade de São Paulo. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 21, n.6, p.647-657, Nov./dez., 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v21n6/a04v21n6.pdf>>. Acesso em: 10/02/2012.
- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/ NEPA-UNICAMP.- Versão II. 2ª Ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006.
- TERRA, J.; ANTUNES, A. M.; BUENO, M. I. M. S.; PRADO, M.A. Um método verde, rápido e simples para determinar o valor energético de farinhas e cereais matinais. **Química Nova**, v.33, N.5, p.1098-1103, 2010.
- TORRES, M.A.A., et al. Fortificação do leite fluido na prevenção de anemia carencial ferropriva em crianças menores de 4 anos. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v.30, n.4, 1996.

TUMA, R.B., et al. Impacto da farinha de mandioca fortificada com ferro aminoácido quelato no nível de hemoglobina de pré-escolares. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.16, n.1, p.29-39, jan./mar., 2003.

VELLOZO, E.P., FISBERG, M. O impacto da fortificação de alimentos na prevenção da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.32, n.2, p.134-139, 2010.

VELLOZO, E.P., SILVA, R., FAGIOLI, D. Pão enriquecido com ferro na prevenção da anemia em crianças matriculadas em creches da Prefeitura do Município de São Paulo. **Revista Nutrição em Pauta**, São Paulo, Nov./dez, 2003.

VIEIRA, A.C.F., et al.. Avaliação do estado nutricional de ferro e anemia em crianças menores de 5 anos de creches públicas. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.83, n.4, p.370-376, 2007.

VITOLLO, M.R., BORTOLINI, G.A. Biodisponibilidade do ferro como fator de proteção contra anemia entre crianças de 12 a 16 meses. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.83, n.1, p.33-38, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jped/v83n1/v83n1a07.pdf>>. Acesso em: 02/04/2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preventing and controlling iron deficiency anemia through primary health care a guide for health administrators and programme managers**. Geneva:, 1989. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9241542497.pdf>. Acesso em: 10/01/2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The prevalence of anaemia in women**. Geneva, 1992. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/1992/WHO_MCH_MSM_92.2.pdf>. Acesso em: 15/01/2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Iron deficiency anaemia. Assesment, prevention, and control. A guide for programme managers**. Geneva: WHO/ United Nations Children´s Fund/ United Nations University; 2001. 130 p. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_NHD_01.3.pdf>. Acesso em: 06/10/2010

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on food fortification with micronutrients**. Geneva, Library; 2006. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/guide_food_fortification_micronutrients.pdf>. Acesso em: 16/04/2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005**. Geneva: WHO/ United Nations Children´s Fund/ United Nations University; 2008. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf>. Acesso em: 06/10/2010.