



Ciência e Tecnologia de Alimentos

ISSN: 0101-2061

revista@sbcta.org.br

Sociedade Brasileira de Ciência e

Tecnologia de Alimentos

Brasil

BUENO, Luciana

Efeito do triglicerídeo de cadeia média, fibra e cálcio na disponibilidade de ferro, magnésio e zinco em uma formulação de alimentação enteral com otimização conjunta para os três minerais

Ciência e Tecnologia de Alimentos, vol. 28, núm. 1, 2008, pp. 125-134

Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Campinas, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=395940090020>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

Efeito do triglicerídeo de cadeia média, fibra e cálcio na disponibilidade de ferro, magnésio e zinco em uma formulação de alimentação enteral com otimização conjunta para os três minerais

Effect of medium-chain triglycerides, fiber, and calcium on enteral feeding formulation optimized for the availability of iron, magnesium and zinc

Luciana BUENO^{1*}

Resumo

A terapia nutricional com dietas enterais vem se especializando muito nos últimos anos. Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito dos componentes das formulações de dietas enterais: fibra, cálcio e triacilglicerídeos de cadeia média, visando otimizar uma formulação para a dialisabilidade de ferro, magnésio e zinco, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta para Misturas. De acordo com os resultados, a melhor formulação de alimentação enteral otimizada em função da dialisabilidade do ferro, magnésio e zinco foi a proporção de 32,5% de TCM e fibra e 35% de cálcio, o que caracterizou uma formulação otimizada simultaneamente para os três minerais.

Palavras-chave: delineamento experimental; disponibilidade de nutrientes; alimentação enteral; minerais; disponibilidade.

Abstract

The nutritional therapy with enteral diets has had a major development in the past few years. The aim of this work is to study the effect of the enteral diet formulations components such as fiber, calcium, and medium-chain triglycerides, seeking in order to optimize a formulation for iron, magnesium, and zinc dialysability using the Response Surface Methodology. According to the result, the best enteral diet formulation optimized based on mineral dialysability was the one containing 32,5% of TCM, 32,5% of fiber, and 35% of calcium. It proved the best enteral diet formulation for the availability of iron, magnesium, and zinc.

Keywords: minerals; availability; formulations of nutrients.

1 Introdução

As formulações enterais são sistemas complexos por terem na sua constituição todos os nutrientes presentes nos alimentos, cujos minerais tendem a sofrer processos de interações que acarretariam alterações na absorção de nutrientes, interferindo na qualidade nutricional das dietas enterais (HARVEY, 2001; WINICHAGOON et al., 2006).

A terapia nutricional tem a função de oferecer a melhor formulação para a individualização nutricional do paciente, visando auxiliar nas funções metabólicas dos indivíduos submetidos ao aporte nutricional de uma alimentação enteral. À medida que se busca esclarecer as possíveis interações de nutrientes em uma formulação objetivando a melhoria da qualidade e da eficiência da sua utilização para a prática clínica, pode-se direcionar no tratamento de doenças porque possibilita o fornecimento de nutrientes que possam comprovadamente auxiliar nas funções metabólicas dos indivíduos, submetidos ao aporte nutricional de uma alimentação enteral, por potencializar uma ação mais efetiva da ação de um determinado nutriente na formulação (REDDY; HURREL; COOK, 2006; PALLARÉS, 1993).

Os minerais são nutrientes essenciais para a realização de mais de cem processos enzimáticos, além de exercerem funções na síntese de macronutrientes e em processos fisiológicos no organismo humano, porém seu aproveitamento está correlacio-

nado com os componentes dos alimentos. A biodisponibilidade de minerais é geralmente definida pela medida da proporção do total do elemento contido no alimento, refeição ou dieta que é utilizado para a manutenção normal das funções do organismo (HARVEY, 2001).

A estrutura química das fibras que contêm fitatos e oxalatos, por exemplo, atuam de forma interferente para a disponibilidade do ferro e do zinco em dietas e alimentos. O cálcio impede a absorção de ferro e magnésio em quantidades ainda não conhecidas, o que aumentaria a possibilidade de prejudicar o aproveitamento dos dois minerais (REDDY; HURREL; COOK, 2006; PALLARÉS, 1993).

Ao estudarem vários tipos de dietas e alimentos em diferentes concentrações, com o propósito de mensurar a dialisabilidade do ferro e do zinco para a comparação dos métodos *in vitro* e *in vivo*, alguns autores apresentaram uma correlação estatisticamente significativa, mostrando que os métodos *in vitro* reproduzem as condições do sistema digestório humano e são capazes de predizer os mecanismos de absorção de nutrientes (LUTEN et al., 1996; NARASINGA RAO, 1994). Devido à reconhecida ação do método para o ferro e o zinco, foi proposto no trabalho o seu emprego para medir o aproveitamento do magnésio.

Recebido para publicação em 9/5/2007

Aceito para publicação em 17/7/2008 (002517)

¹ Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo - SP, Brasil, E-mail: lubuenno@yahoo.com.br

*A quem a correspondência deve ser enviada

Este trabalho tem como objetivo estudar as interações dos triglicerídeos de cadeia média (TCMs), da fibra e do cálcio na dialisabilidade do ferro, do magnésio e do zinco na maximização de uma formulação de alimentação enteral simultânea para os três minerais pelo método in vitro.

2 Material e métodos

2.1 Material

A composição centesimal da formulação enteral padrão (Tabela 1) foi selecionada em razão da prescrição para cerca de 80% dos pacientes das diferentes unidades de internação do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

A formulação foi reproduzida em laboratório (Tabela 2) com os respectivos nutrientes que compunham a dieta selecionada e utilizou-se na elaboração da formulação o isolado protéico de soja, a maltodextrina, os óleos de canola, de milho e o TCM, a fibra, os sais minerais e a mistura vitamínica.

Tabela 1. Composição centesimal estimada da dieta enteral hospitalar.

Ingredientes	
Proteínas (g.L ⁻¹)	30,6
Carboidratos (g.L ⁻¹)	137,2
Lipídios (g.L ⁻¹)	37,8
Energia (kcal.L ⁻¹)	1011,0

Tabela 2. Dieta experimental.

Componentes	Valores em 100 g da mistura	Valores em 1 L de dieta diluída ⁶
Proteína total (g)		
IPS ¹	13,34	31,00
Carboidrato total (g)		
Maltodextrina ²	59,12	137,40
Gordura (g)		
Óleo de canola	7,74	18,00
Óleo de milho	5,38	12,50
TCM ³	1,93	4,50
Lecitina de soja ⁴	1,30	3,00
Minerais (g)		
Mistura salina	2,15	5,00
Carbonato de cálcio	0,43	1,00
Vitaminas (g)		
Mistura vitamínica ⁵	4,30	10,00
Fibra (g)		
Goma guar parcialmente hidrolisada ⁵	4,30	10,00
Água destilada (g)	-	767,60
Total (g)	100,00	1000,00

¹Samprosoy NB 90 (Bunge Alimentos do Brasil Ltda.); ²Mor-Rex 1920 (Corn Products Brasil-Ingredientes Industriais Ltda.); ³Support Produtos Nutricionais Ltda; ⁴Lecitina de soja (Bunge Alimentos do Brasil Ltda.); ⁵Novartis Consumer Health Ltda; e ⁶1 L de dieta diluída apresenta 232,4 g de pó.

2.2 Delineamento experimental

As variáveis independentes selecionadas neste estudo foram TCM (x_1), Fibra (x_2) e Cálcio (x_3). Tratando-se de uma formulação em pó para dieta enteral, as variáveis devem obedecer a relação (Equação 1):

$$\sum_{i=1}^q x_i = 1,0 = 100\% \quad (1)$$

As sete dietas foram preparadas e manipuladas (Tabela 4) de acordo com o delineamento experimental utilizado para estudos *centróide simplex* de misturas de três componentes (Figura 1).

O óleo de milho e a maltodextrina foram utilizados para complementar as dietas, mantendo-se o mesmo aporte calórico. Este procedimento permitiu que as sete dietas recomendadas no delineamento centróide simplex mantivessem a mesma proporção de diluição final (232,4 g de pó para 767,6 g de água) e aproximadamente o mesmo valor calórico (1.011,0 kcal.kg⁻¹).

2.3 Análises físico-químicas

Procedimentos analíticos

Os procedimentos analíticos foram realizados segundo as normas propostas pelo AOAC (1995), com amostras em duplicatas ou triplicatas, utilizando-se a caseína AIN – 93G como padrão de referência secundário (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993).

Métodos para determinação de ferro, zinco e magnésio total

Para a determinação da concentração de ferro, zinco e magnésio total presente nas dietas enterais foi utilizado o método de Espectrometria de Absorção Atômica (EAA). As dietas enterais foram digeridas com ácido nítrico (HNO₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em proporção de 5:1, a 100 °C, em bloco digestor (Pyrotec[®]), sendo diluídas com água deionizada em um balão de 50 mL.

Tabela 3. Composição da mistura salina da dieta experimental.

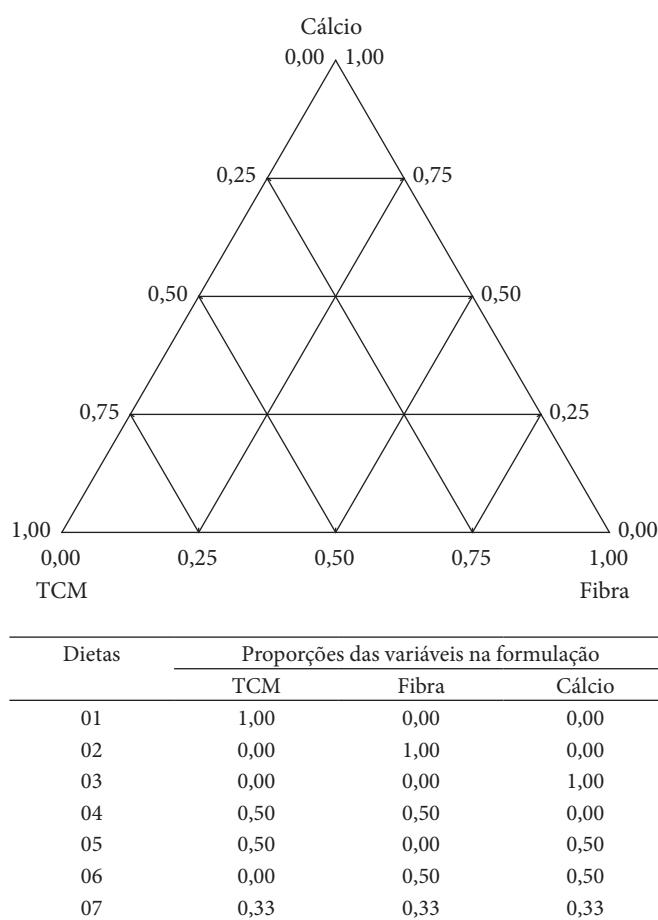
Sais - valor em 100 g da mistura salina	Elemento	Quantidade do elemento em 100 g da mistura salina	Quantidade do elemento em 1 L de dieta diluída ¹
FeSO ₄ .7H ₂ O (1,00 g)	Ferro	200,00 mg	10,00 mg
MgCO ₃ (8,00 g)	Magnésio	2,29 g	115,00 mg
KH ₂ PO ₄ (48,00 g)	Fósforo	11,13 g	557,00 mg
	Potássio	14,04 g	702,00 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O (0,316 g)	Zinco	72,00 mg	3,60 mg
KIO ₃ (0,024 g)	Iodo	14,40 mg	0,72 mg
MnSO ₄ .H ₂ O (0,054 g)	Manganês	17,64 mg	0,88 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O (0,0046 g)	Cobre	11,88 mg	0,59 mg
NaCl (24,00 g)	Sódio	9,22 g	461,00 mg
Maltodextrina (18,56 g)	Cloro	14,24 g	712,00 mg
Total (100 g)			

¹Diluição: 5 g de mistura salina/1 L de dieta.

Tabela 4. Formulações das dietas experimentais que compuseram o delineamento experimental.

Ingredientes (g)	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7
IPS	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0
Maltodextrina	148,4	131,4	131,4	139,9	131,4	139,9	137,0
Óleo de milho	-	17,0	17,0	8,5	17,0	8,5	11,3
Óleo de canola	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0
TCM	17,0	-	-	8,5	-	8,5	5,7
Lecitina de soja	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Fibra	-	17,0	-	8,5	8,5	-	5,7
Mistura salina	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Carbonato de cálcio ¹	-	-	17,0	-	8,5	8,5	5,7
Mistura vitamínica	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Água	767,6	767,6	767,6	767,6	767,6	767,6	767,6
Total (g)	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0

¹Mistura de carbonato de cálcio contendo 15,0 g de maltodextrina e 2,0 g de carbonato de cálcio.

**Figura 1.** Delineamento centróide simplex.

As leituras das amostras e das curvas padrão foram realizadas no Polarized Zeeman AAS Hitachi Z-5000, por chama e ar/acetileno oxidante, nas seguintes condições: lâmpada de cátodo oco, comprimento de onda de 248,3 nm para o ferro, 213,9 nm para o zinco e 202,6 nm para o magnésio; fenda 0,2 nm para o ferro e o zinco e de 1,3 nm para o magnésio. As soluções da curva padrão do ferro foram: o Cloreto Férrico Titrisol Merck® 9972, nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{gFe.mL}^{-1}$ e

as de zinco e magnésio a partir das soluções de Cloreto de Zinco Titrisol Merck® 9953 e o Nitrato de Magnésio em ácido nítrico nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{gZn.mL}^{-1}$ e 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,5; 10,0 $\mu\text{gMg.mL}^{-1}$.

Para as leituras das quantidades de magnésio nas amostras foi utilizada uma solução de óxido de lantâno a 1%, para evitar a provável interferência com outros minerais.

Métodos para determinação do ferro, zinco e magnésio dialisados

O método utilizado para a determinação da dialisabilidade dos minerais foi o de Miller et al. (1996) e modificado por Luten et al. (1981) para avaliação da biodisponibilidade do ferro em alimentos e dietas, que envolve a simulação da digestão gastrintestinal, seguida da determinação do mineral solúvel e consiste em duas etapas básicas que simulam a digestão: gástrica e duodenal.

Em linhas gerais, a dieta enteral foi submetida à digestão com pepsina, após acidificação do meio com HCl 6N até pH 2, seguida de digestão com pancreatina/bile, após a alcalinização do meio a pH 7, com NaHCO_3 contido em tubos de diálise.

No final do último período de digestão, os segmentos de tubos de diálise foram lavados com água desionizada e seu conteúdo colocado em balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume final completado com água desionizada e condicionado em freezer até o momento da leitura.

Metodologia de superfície de resposta

As condições experimentais foram realizadas pela análise estatística multivariada com a aplicação de modelos matemáticos pela técnica de superfície de resposta para misturas. Utilizando-se o teorema dos mínimos quadrados que mostram os valores ao redor da média para cada variável, foram elaborados os modelos lineares, quadráticos e cúbicos especiais para cada uma das variáveis quantitativas estudadas: ferro, zinco e magnésio. Com isso, se obtêm os modelos de regressão com todas as variáveis de interesse estudadas. Para a avaliação do modelo foram gerados os parâmetros de análise de regressão e de análise de variância. Devido ao planejamento experimental

adotado, pelos dados experimentais foi gerada, para cada uma das variáveis de interesse, a construção do triângulo centróide simplex, baseado nos pontos médios do modelo de mínimos quadrados, que correspondem às proporções esperadas em relação a suas proporções geométricas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

A equação polinomial que descreve o modelo mais simples (linear) para os três componentes da mistura de interesse para avaliar a disponibilidade de magnésio dialisado pode ser representada pela Equação 2:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \epsilon \quad (2)$$

em que: y_i é o valor da propriedade de interesse; β_0 e β_i 's são os coeficientes do modelo a serem estimados pelo método dos mínimos quadrados; x_i representa as variáveis dependentes codificadas e o ϵ é o erro aleatório.

Multiplicando-se β_0 pela identidade ($x_1 + x_2 + x_3$) e isolando-se as variáveis, tem-se a chamada equação polinomial canônica de Sheffé ou polinomial $\{q,m\}$, onde q é igual ao número de componentes e m é igual ao grau da equação (12-14). No caso de linearidade $\{3, 1\}$, teremos a Equação 3:

$$y_i = b_{*1} x_1 + b_{*2} x_2 + b_{*3} x_3 \quad (3)$$

em que: $b_{*i} = b_0 + b_i$

e teremos ainda: $y_i = b_{*1} x_1 + b_{*2} x_2 + b_{*3} x_3$

em que: $b_{*i} = b_0 + b_i$ (modelo linear)

$$y_i = b_{*1} x_1 + b_{*2} x_2 + b_{*3} x_3 + b_{*12} x_1 x_2 + b_{*13} x_1 x_3 + b_{*23} x_2 x_3$$

Sendo: $b_{*i} = b_0 + b_i + b_{ii}$ (modelo quadrático)

$$e: y_i = b_{*1} x_1 + b_{*2} x_2 + b_{*3} x_3 + b_{*12} x_1 x_2 + b_{*13} x_1 x_3 + b_{*23} x_2 x_3 + b_{*123} x_1 x_2 x_3 \quad (\text{modelo cúbico especial}).$$

Portanto, para a estimativa do valor dos coeficientes b_{*i} são necessários pelo menos três ensaios experimentais. Da mesma forma, para modelos mais complexos como o quadrático ou o cúbico especial, são necessários seis e sete ensaios, respectivamente. Como a diferença nos termos do delineamento entre o modelo quadrático e o modelo cúbico especial é de apenas um ensaio experimental, optou-se pela utilização de um planejamento experimental do tipo centróide simplex com sete ensaios experimentais (CASTRO; TIRAPEGUI; SILVA, 2000; CORNELL, 1990).

No que se refere à optimização da formulação de alimentação enteral, buscou-se uma resposta que fosse compatível com as explicações fisiológicas e com o objetivo de se maximizar os três minerais, portanto, foi optimizada uma formulação para cada um dos minerais separadamente.

A optimização das respostas em conjunto para os três minerais, que é feita pela função de deseabilidade global que está entre a faixa de aceitabilidade [0;1] e as respostas a serem maximizadas, são os valores mínimos e máximos das quantidades dos nutrientes que foram utilizados no delineamento experimental. Para todos os valores constantes a derivada da função descreve uma anulidade, o que gera a média geométrica que faz com que a deseabilidade global se anule sempre que uma das variáveis de

respostas tiver um valor inaceitável, não importando o grau de satisfatoriedade dos valores das outras respostas, sendo possível optimizar múltiplas variáveis em função de modelos quadráticos e cúbicos, de acordo com o desenho experimental (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Análise estatística

A estimativa do valor dos coeficientes de todas as regressões foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, adotando-se um valor de $p \leq 0,05$, para todos os ensaios. A adequação dos modelos propostos foi avaliada pela análise do resíduo, comparando-se a proporção da variação que é explicada pelo modelo, isto é, pela análise do coeficiente de determinação R^2 .

Uma vez obtido um modelo polinomial ajustado à resposta, sua optimização foi feita pela técnica proposta por Derringer e Suich (1980). Esta se baseia na definição de uma função de deseabilidade restrita no intervalo de [0,1], para a qual se adotou como limites inferior, médio e superior nos valores de 0; 0,5 e 1,0, respectivamente. Os cálculos e gráficos foram elaborados utilizando-se o programa STATISTICA V.6 (1998).

3 Resultados e discussão

Todos os modelos de regressão (linear, quadrático e cúbico especial) para os valores de ferro, magnésio e zinco dialisados se mostraram significativos ($p < 0,05$). Portanto, para todos os modelos rejeitamos a hipótese de nulidade ($H_0 = \beta_1 = \beta_2 = \beta_3$), demonstrando a dependência das respostas nas proporções dos nutrientes estudados nas misturas elaboradas no delineamento. Para a verificação da adequação dos modelos empíricos, foi determinante o valor de F calculado maior que o F tabelado ($F_{4,16} = 3,01$ para o ferro, $F_{3,15} = 3,29$ para o magnésio e $F_{5,15} = 2,90$ para o zinco), e não houve evidência de falta de ajuste ($F_{2,14} = 3,74$ para o ferro, $F_{3,12} = 3,49$ para o magnésio e $F_{1,14} = 4,60$ para o zinco) para um nível de 95% de significância (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Os métodos *in vitro* de avaliação da biodisponibilidade de ferro são relativamente simples, rápidos e baratos, relacionando-se com a biodisponibilidade *in vivo* e constituem-se numa simulação da digestão gástrica e duodenal, seguida de diálise. A proporção do elemento difundida através da membrana semi-permeável, durante o processo, representa a dialisabilidade do elemento, após um período de equilíbrio, sendo utilizado como estimativa da biodisponibilidade do nutriente (PUSHPANJALI; KHOKHAR, 1996; CHIPLONKAR et al., 1999). A técnica multivariada foi empregada porque possibilita a optimização de processos de produção e industriais, através dos quais se permite avaliar os efeitos das interações entre as variáveis e as respostas (KAHYAOGLU; KAYA, 2006).

Para todos os minerais avaliados (ferro, magnésio e zinco) foram obtidos os modelos matemáticos pela técnica estatística de superfície de resposta para misturas. Três repetições foram preparadas para cada ensaio e os valores obtidos para as percentagens de dialisabilidade para o ferro, o magnésio e o zinco pelas condições estabelecidas no delineamento experimental (Tabela 5).

Para as respostas porcentagem de ferro, magnésio e zinco dialisados, (Tabela 6) podem ser mostrados os fatores de variação obtidos pela análise de variância para cada um dos modelos empíricos. Podem-se observar os valores do teste *F*, do nível de significância estatística *p* e da variação explicada do coeficiente de regressão *R*² em que se pode verificar a adequação dos modelos às respostas avaliadas para cada um dos três minerais.

A estimativa da resposta \hat{y} “porcentagem de ferro dialisado” foi obtida de um modelo quadrático ajustado pelos dados experimentais e seus respectivos erros padrão, conforme mostra a Equação 4, para predizer a relação da resposta com os três nutrientes estudados no delineamento experimental.

$$\hat{y} = 5,58x_1 + 4,50x_2 + 1,30x_3 + 5,32x_1x_3 + 15,42x_2x_3 \quad (4)$$

(0,31) (0,31) (0,34) (1,57) (1,57)

O contorno das curvas obtidas para a resposta \hat{y} (x) porcentagem de ferro dialisado em função das 3 variáveis (x_1 , x_2 , x_3), mostra que os maiores valores de \hat{y} (x) estão associados à interação x_2x_3 (Figura 2). A análise de variância que foi realizada com os dados experimentais obtidos através da reprodução na dieta enteral nas proporções apresentadas na Figura 2 e determinada a porcentagem do ferro dialisado nas mesmas condições em que foram elaboradas inicialmente. Pode-se concluir que os resultados foram validados (Figura 3).

Dentre todos os efeitos sinérgicos observados para o ferro dialisado, o efeito mais pronunciado foi o da interação binária fibra e cálcio. Por serem altamente fermentáveis, atuarem através da ação bacteriana no cólon e apresentarem uma capacidade de ligação com minerais, principalmente com o cálcio, as fibras solúveis têm sido recomendadas em dietas enterais. A capacidade de translocação dos locais absorptivos do cálcio do intestino delgado para o ceco e cólon, onde, ao serem degradadas, aumentam a produção de ácidos graxos de cadeia curta, leva a uma diminuição do pH, o que induziria o aumento da absorção do cálcio nessa região do intestino (SLAVIN; GREENBERG, 2003).

Tabela 5. Porcentagem de ferro (% FeD), magnésio (% MgD) e zinco (% ZnD) dialisados das dietas enterais com diferentes proporções de TCM, fibra e cálcio.

Dieta	TCM	Fibra	Cálcio	Média (% FeD)	Média (% MgD)	Média (% Zn)
1	1,00	0,00	0,00	5,40 (0,44)	3,60 (1,00)	21,30 (3,50)
2	0,00	1,00	0,00	4,32 (0,10)	11,05 (2,22)	19,88 (3,80)
3	0,00	0,00	1,00	1,25 (0,18)	9,04 (0,10)	1,02 (0,12)
4	0,50	0,50	0,00	5,50 (0,49)	5,80 (0,69)	3,70 (1,65)
5	0,00	0,50	0,50	6,90 (0,64)	11,05 (1,30)	1,40 (0,30)
6	0,50	0,00	0,50	4,90 (0,64)	5,38 ^(*) (0,06)	2,13 (0,50)
7	0,33	0,33	0,33	5,70 (0,33)	13,27 ^(*) (2,21)	1,02 (0,07)

* (n = 3); e (n - 2).

Tabela 6. Fatores de variação para as respostas de porcentagem de ferro, magnésio e zinco dialisados.

Nutrientes	Valor do teste <i>F</i>	Valor de <i>p</i> ^{**}	Coeficiente de determinação (<i>R</i> ²)
Ferro	39,08	0,0000	0,91
Magnésio	21,60	0,0000	0,82
Zinco	64,34	0,0000	0,96

^{**}Significativo com 95% de probabilidade (*p* < 0,01).

A goma guar e a goma guar parcialmente hidrolisada são mais importantes do que outros tipos de fibras na produção de ácidos graxos de cadeia curta por atuarem na microflora intestinal em humanos (VELÁZQUEZ et al., 2001). Spacen et al. (2001) observaram que pacientes com ileo paralítico mostraram menor incidência de diarréia e menor comprometimento das funções intestinais, submetidos à nutrição enteral com fibra solúvel. Nesse aspecto, a goma guar hidrolisada foi mais efetiva do que outros tipos de fibra, devido às suas características para maior produção de ácidos graxos de cadeia curta no cólon.

As estudarem as interações de Fe^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{3+} em dietas enterais através de métodos *in vitro* simulando condições digestivas em diferentes concentrações de fibra solúvel e insolúvel nas dietas

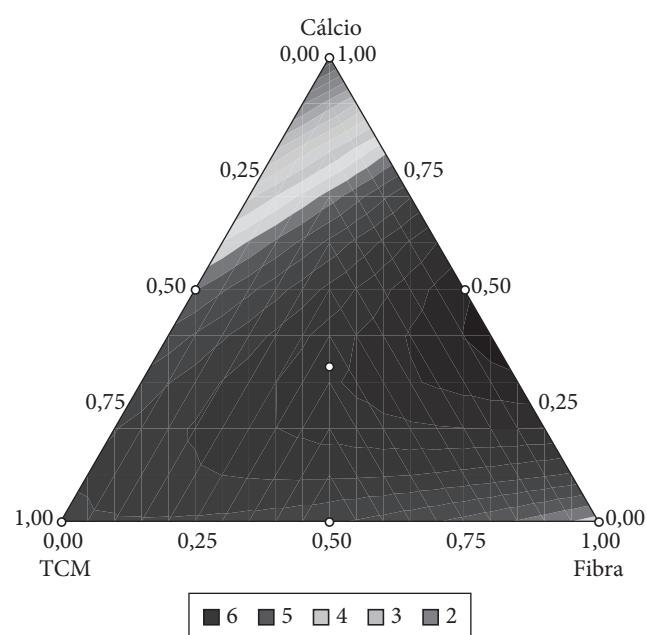


Figura 2. Curvas de nível para a resposta do ferro dialisado.

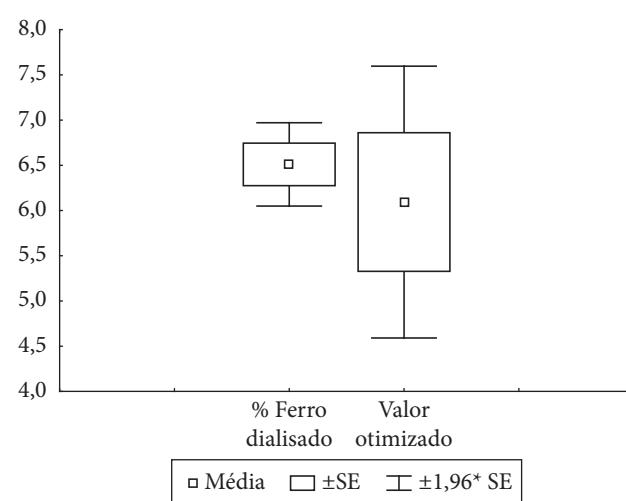


Figura 3. Validação da dieta otimizada para o ferro dialisado. Variação entra a % de ferro dialisado dos dados experimentais e a % de ferro obtida pela formulação otimizada % ferro dialisado versus valor otimizado.

e diferentes pHs, os autores observaram que altas quantidades de fibra e condições físico-químicas não adequadas podem levar a uma má absorção de cátions no organismo humano. A dialisabilidade de cálcio foi de 2,5%, em média, e sofreu interferências devido à presença de maiores quantidades de fibra nas dietas, mostrando que os componentes da fibra e os íons metálicos cálcio e ferro podem ser muito afetados com esses nutrientes (TORRE; RODRIGUEZ; SAURA-CALIXTO, 1995).

Ao estudarem os efeitos das fibras alimentares utilizando frações isoladas de fibra, para avaliar a disponibilidade de ferro, cálcio e zinco por métodos *in vitro* e *in vivo*, os autores observaram que em humanos a goma guar tem a capacidade de se agrupar em estruturas onde o mineral passa a fazer parte da composição estrutural e química do composto sem formar colóides e complexos de difícil hidrólise, mecanismo observado tanto para o Fe^{2+} como para o Zn^{2+} (TORRE; RODRIGUEZ; SAURA-CALIXTO, 1991).

Ao avaliarem a biodisponibilidade de cálcio e ferro em vegetais folhosos, pelo método *in vitro* de diálise, os autores concluíram que os componentes presentes na estrutura química desses alimentos como oxalatos, fibras, taninos e ácido fítico são os principais interferentes da biodisponibilidade de ferro (GUPTA; LAKSHMI; PRAKASH, 2006).

Os pesquisadores, ao avaliarem o consumo de leite de vaca na primeira infância, salientaram que ele pode aumentar a incidência de anemia ferropriva em crianças porque o alimento apresenta baixa biodisponibilidade e densidade para o ferro, excesso de proteínas e cálcio, além de poder interferir na absorção de ferro proveniente de outros alimentos da dieta (OLIVEIRA; OSÓRIO, 2005).

Ao avaliarem o efeito da biodisponibilidade do cálcio, ferro e zinco em amostras de leite de vaca fortificadas ou não com cálcio, através dos métodos *in vitro* do dialisado e do cultivo celular Caco 2, os resultados mostraram que a própria matriz tende a diminuir a biodisponibilidade do cálcio, verificada nos leites não fortificados, o que pode ser explicado pela interação do cálcio com os componentes do leite, principalmente com a proteína do leite, e formação de compostos insolúveis que tendem a prejudicar o aproveitamento do mineral. O leite fortificado diminui a biodisponibilidade de ferro e zinco, pela interação desses nutrientes com o cálcio, e os autores concluíram que a interação entre os minerais e o leite desfavorece que o alimento seja utilizado em programas de combate a carências nutricionais de minerais (PERALES et al., 2006).

Na mistura avaliada, a interação binária TCM-cálcio foi outro fator importante para a dialisabilidade do ferro. Essa interação pode indicar um mecanismo semelhante ao descrito para a interferência entre fibra solúvel e cálcio (SLAVIN; GREENBERG, 2003; TORRE; RODRIGUEZ; SAURA-CALIXTO, 1991; CLAYE; IDOURAINE; WEBER, 1998). Assim, alimentos ou dietas que contenham compostos de estruturas menos complexas (como os TCMs) podem se ligar ao cálcio na presença de grandes quantidades do mineral, e com isso favorecer a disponibilidade de ferro nas dietas enterais.

Os autores mostraram que a gordura presente no leite, caracterizada em fontes naturais dessas matrizes, se constitui de

quantidades razoáveis de colesterol e ácidos graxos saturados, como os triacilgliceróis de cadeia média. Ao compararem os efeitos dos componentes do leite na biodisponibilidade do cálcio, nos ratos em crescimento, os autores concluíram que o mineral apresentou interações com os componentes do leite, mostrando a interferência da própria estrutura química do leite na absorção do cálcio, devido à formação de compostos insolúveis tendem a diminuir a disponibilidade do mineral (RODRIGUES; GIOIELLI; ANTON, 2003; TOBA et al., 1999).

A interação terciária TCM/fibra/cálcio mostrou-se importante para a dialisabilidade do magnésio, devido ao sinergismo observado com a resposta avaliada, indicando que esses três nutrientes presentes em condições ideais podem favorecer a absorção do mineral e ainda propiciar um avanço significativo na elaboração de dietas enterais específicas quando se visa minimizar a deficiência do mineral.

Em um estudo de metanálise em que foi avaliada a utilização das fibras em fórmulas de alimentação enteral, mostrou-se que houve redução do tempo de internação hospitalar em pacientes transplantados de fígado e de pacientes com intervenção cirúrgica abdominal. Para os casos de diarréia e infecção, em que foi empregada a fibra na alimentação, foi observado um controle nos pacientes transplantados de fígado, de intervenção cirúrgica abdominal e com íleo paralítico, em razão de um benefício no quadro clínico dos pacientes (YANG et al., 2005).

A forma química dos minerais e fibras contidas em alimentos ou em dietas, principalmente na presença de oxalatos e fitatos, impede a absorção de ferro, zinco, cobre e cálcio. Por isso, em dietas enterais existe a preocupação de serem adicionados substratos que não venham a impedir a biodisponibilidade de nutrientes, levando pacientes à desnutrição pela ausência de minerais essenciais para as funções metabólicas do organismo humano (REDDY; HURREL; COOK, 2006; TORRE; RODRIGUEZ; SAURA-CALIXTO, 1995; TORRE; RODRIGUEZ; SAURA-CALIXTO, 1991).

Para a avaliação de resposta do magnésio, \hat{y} “porcentagem de magnésio dialisado”, foi obtido o modelo cúbico especial ajustado pelos dados experimentais para predizer os coeficientes de regressão e o erro padrão, como mostra a Equação 5. A adequação do modelo obtido pode ser observada pelos valores de F , do nível de significância estatística e da variável explicada para o magnésio dialisado (Tabela 6).

$$\hat{y} = 9,30x_1 + 2,83x_2 + 11,00x_3 + 162,52x_1x_2x_3 \quad (5)$$

(0,84) (0,84) (0,83) (34,46)

Esses coeficientes apresentaram valores de $b^*_{1}x_1$, $b^*_{2}x_2$, $b^*_{3}x_3$ e $b^*_{123}x_1x_2x_3$ em que $b^* > 0$, o que significou um sinergismo entre as variáveis selecionadas e a resposta avaliada, mostrando uma combinação entre os nutrientes, agregados à importância da interação terciária.

Na Figura 4 apresentam-se as curvas de nível que representam os contornos obtidos para a resposta \hat{y} (x) porcentagem de magnésio dialisado para as três variáveis (x_1 , x_2 , x_3), na qual se observa que os valores de \hat{y} (x) estão associados aos triacilglicerídeos de cadeia média, fibra, cálcio e à interação terciária, que

representam as combinações entre os três nutrientes, típicas de um modelo cúbico especial.

Ao avaliarem as concentrações de magnésio e cálcio séricos em idosos institucionalizados, os autores concluíram que houve correlação positiva estatisticamente significativa nas quantidades de magnésio e fibras, ferro, fósforo e cálcio presentes nas dietas consumidas pelos idosos. Isso implica dizer que o aumento da ingestão de magnésio na dieta é dose-dependente com relação aos nutrientes. A correlação positiva com o cálcio sugeriu uma regulação homeostática similar entre o cálcio e o magnésio (GÁMEZ et al., 1997).

Ao avaliarem o consumo de magnésio em homens e mulheres em comparação aos valores de recomendação de magnésio pelas DRIs, através do balanço metabólico do mineral, concluíram que a estimativa de magnésio pode estar aumentada devido à falta de avaliação da interação entre os alimentos nas dietas (HUNT; JOHNSON, 2006).

Os TCMs quando ministrados em dietas enterais, para pacientes no período pós-operatório, reduzem significativamente o risco de complicações no trato gastrintestinal e de infecções, por modular a produção de eicosanoides antiinflamatórios, e os riscos de problemas renais e hepáticos por auxiliarem no metabolismo de lipídios (TSO; LEE; DEMICHELE, 1999). Devido às propriedades fisiológicas dos triacilglicerídeos de cadeia média, é interessante mantê-los nas formulações enterais porque sua eficácia faz com que pacientes tenham maior tolerância à alimentação, menor complicações no trato gastrintestinal e melhor absorção de nutriente, em consequência de uma ação metabólica mais efetiva.

Os resultados obtidos para a dialisabilidade de zinco à resposta \hat{y} “porcentagem de zinco dialisado” foram caracterizados em um modelo quadrático ajustado pelos dados experimentais, mostrado na Equação 6 no qual podem ser observados os valores

dos coeficientes de regressão e o erro padrão para cada um dos nutrientes e para as interações binárias.

$$\hat{y} = 21,13x_1 + 19,70x_2 + 0,80x_3 - 73,35x_1x_2 - 26,32x_1x_3 - 29,76x_2x_3 \quad (6)$$

(1,24) (1,24) (1,24) (5,73) (5,73) (5,73)

Os valores dos fatores de variação, obtidos pela análise de variância para o modelo quadrático ajustado pelos dados experimentais para o zinco (Tabela 6), no qual podem ser observados os valores de F, do nível de significância estatística e da variação explicada definiram a adequação do modelo para a resposta de interesse.

Na Figura 5 apresentam-se as curvas de contorno obtidas para a resposta \hat{y} (x) porcentagem de zinco dialisado para as três variáveis (x_1, x_2, x_3), na qual se observa que os maiores valores de \hat{y} (x) estão associados aos triacilglicerídeos de cadeia média e à fibra, porém, todas as interações binárias foram negativas de acordo com os coeficientes mostrados.

Em nossos estudos, de acordo com os resultados obtidos, todas as interações estudadas se mostraram estatisticamente significativas para a disponibilidade de zinco, porém elas indicaram o antagonismo da resposta em relação ao ferro. De acordo com Solomons e Ruiz (1997), existe uma interação antagônica entre o zinco e o ferro presentes em dietas e alimentos. Uma vez que esses íons são quimicamente semelhantes, e quando juntos no lúmen intestinal competem pelos mesmos sítios de absorção, além do zinco apresentar maior massa molecular que o ferro (MMZn = 65,37/MMFe = 55,85), este tende a excluir o ferro no momento da entrada do íon na célula intestinal, deixando de ser absorvido pela borda em escova no enterócito. Dois mecanismos podem explicar sua variabilidade biológica: o de competição e o de co-adaptação. A principal diferença entre elas está na quantidade de ferro e zinco contida em alimentos ou dietas alimentares. A característica para que ocorra o processo de adaptação é manter as quantidades de ferro e zinco iguais em mg.L^{-1} , no caso

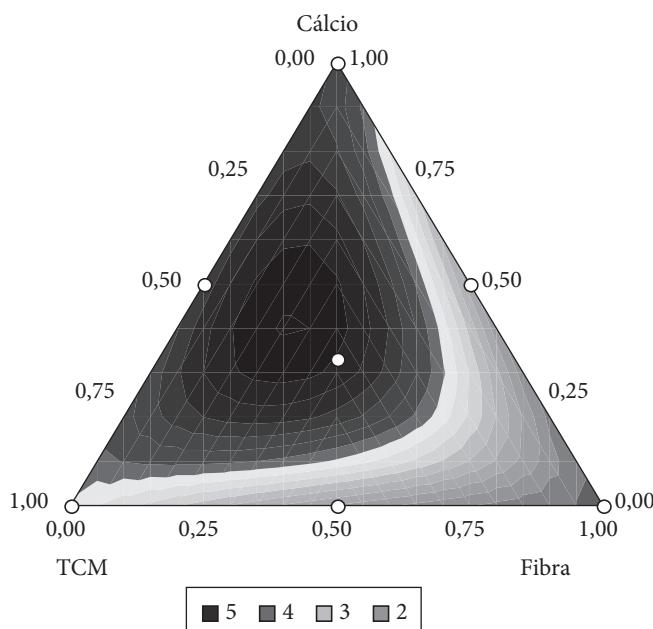


Figura 4. Curvas de nível para a resposta do magnésio dialisado.

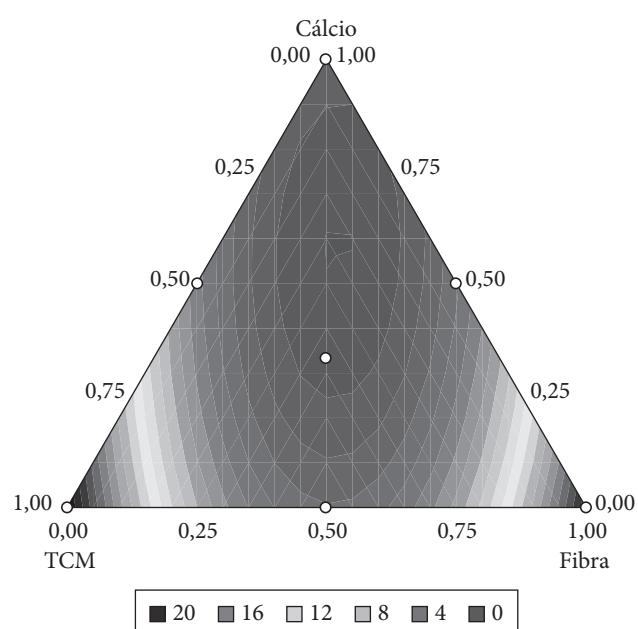


Figura 5. Curvas de nível para a resposta do zinco dialisado.

das dietas enterais. Para que ocorra o processo de competição, pequenas quantidades de ferro em relação ao zinco, 2:1 respectivamente, passam a caracterizar um processo de competição, e um antagonismo entre os dois minerais fica evidente.

Perales et al. (2006) ao avaliarem a biodisponibilidade de zinco em fórmulas infantis, pelo método *in vitro* de dialise, concluíram que o zinco sofre interferências com os componentes desses alimentos diminuindo a sua biodisponibilidade. Os efeitos de interação entre os nutrientes puderam ser observados através da aplicabilidade de um método que simula as condições digestivas do trato gastrintestinal humano, através do qual se detectou a formação de complexos insolúveis com as estruturas de baixo peso molecular, entre elas, aminoácidos e cálcio, provenientes da fonte protéica. Os autores ressaltaram que os resultados podem ser correlacionados com os obtidos com humanos, quando se visa avaliar o aproveitamento de nutrientes provenientes nas fórmulas infantis.

Ma et al. (2005) ao avaliarem a dieta chinesa, rica em cereais e leguminosas, como: trigo, arroz, milho e soja, observaram que esses alimentos apresentaram quantidades diferentes de fitatos, devido às diferentes espécies, e que houve uma diminuição estatisticamente significativa na biodisponibilidade de cálcio, ferro e zinco inversamente proporcional às quantidades de fitato. Observou-se que o fato pode ser explicado em razão de uma propriedade ligante do fitato com os minerais, presentes nos alimentos, o que levou à formação de compostos insolúveis que impedem o aproveitamento dos nutrientes. Os autores ressaltaram a importância de estudos

de interações entre os nutrientes e de processos de otimização para minimizar esses efeitos, principalmente em populações que apresentam hábitos alimentares específicos.

Porres et al. (2003) ao estudarem o efeito da fermentação natural de cereais e leguminosas no trato gastrintestinal em relação ao aproveitamento de minerais, optaram por utilizar o método *in vitro* de dialise, por simulação das condições do sistema digestório humano. Os autores mostraram que foi possível a caracterização da composição química dos alimentos nas etapas de digestão e absorção, em decorrência das condições metodológicas pré-estabelecidas, e concluíram que diferentes condições fermentativas associadas às condições de digestão/absorção mostraram a maior ou menor caracterização da interação entre o ferro e o zinco, em um mecanismo de competição, intensificado na fase absorptiva, onde foram verificadas concentrações inversamente proporcionais entre os dois minerais.

No que se refere à otimização conjunta dos três minerais na formulação, na Figura 6 apresenta-se a maximização da formulação proposta na otimização conjunta dos modelos empíricos na busca de resposta para o ferro, magnésio e zinco dialisados, de acordo com os resultados obtidos nos modelos quadráticos (ferro e zinco) e cúbico especial (magnésio), ajustados pelos dados experimentais.

Os valores de TCM, fibra e cálcio da dieta experimental em comparação à dieta otimizada e sua maximização para a dialisabilidade dos três minerais estão na Tabela 7.

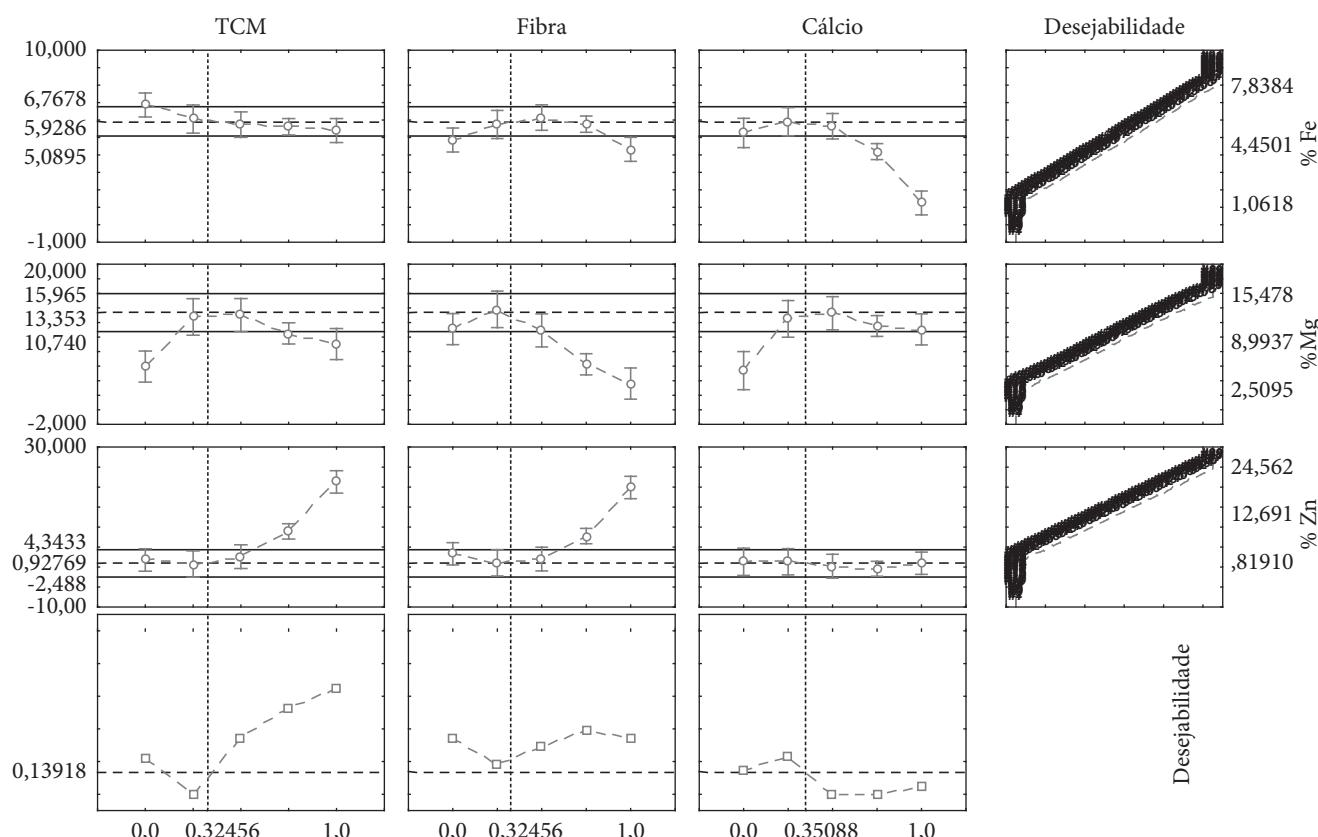


Figura 6. Otimização de uma formulação de alimentação enteral para o ferro, magnésio e zinco dialisados. Valores preditivos de desejabilidade para a formulação otimizada para o ferro, magnésio e zinco.

Tabela 7. Alimentação enteral: dieta experimental e otimizada para a porcentagem de ferro, magnésio e zinco dialisados.

Ingredientes	Dieta experimental	Otimizada
Proteína (g)	31,0	31,0
Carboidrato (g)	138,0	142,2
Fibra (g)	10,0	5,5
Óleo de milho (g)	12,5	11,5
Óleo de canola (g)	18,0	18,0
TCM (g)	4,5	5,5
Lecitina (g)	3,0	3,0
Cálcio (mg)	400,0	280,0
Ferro (mg)	10,0	10,0
Zinco (mg)	3,6	3,6
Magnésio (mg)	115,3	115,3
Vitamina C (mg)	50,0	50,0
Total de dieta (g)	1000,0	1000,0

4 Conclusões

Na resposta conjunta caracterizada pela otimização dos três minerais foi determinada uma formulação que apresentasse a melhor disponibilidade de ferro, de zinco e de magnésio. A proporção definida foi de 32,50% de triacilglicerídeos de cadeia média e fibra e 35% de cálcio, sendo uma formulação que se constituiu dos três nutrientes estudados no delineamento experimental.

Agradecimentos

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e ao Laboratório de Minerais, pela possibilidade de realização desse trabalho.

Referências bibliográficas

- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 16 ed. Washington: AOAC, 1995. v. 2.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.
- CASTRO, I. A.; TIRAPEGUI, J.; SILVA, R. S. S. F. Protein Mixtures and Their Nutritional Properties Optimized by Response Surface Methodology. *Nutrition Research*, v. 20, n. 9, p. 1341-1353, 2000.
- CHIPLONKAR, S. A. et al. In Vitro Dialyzability Using Meal Approach as na Index for Zinc and Iron Absorption in Humans. *Biological Trace Element Research*, v. 67, n.1, p. 249-255, 1999.
- CLAYE, S. S.; IDOURAINE, A.; WEBER, C. W. In-vitro mineral binding capacity of five fiber sources and their insoluble components for magnesium and calcium. *Food Chemistry*, v. 61, n. 3, p. 333-338, 1998.
- CORNELL, J. A. **Experiments with mixtures, designs, models and the analysis of mixture data**. 2 ed. Nova York: John Wiley & Sons, 1990.
- DERRINGER, G. SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, v. 12, n. 1, p. 214-219, 1980.
- GÁMEZ C. et al. Serum concentration and dietary intake of Mg and Ca in institutionalized elderly people. *Science & Environmental Health Network*, v. 203, n. 1, p. 245-251, 1997.
- GUPTA, S.; LAKSHMI, A.; PRAKASH, S. In vitro bioavailability of calcium and iron from selected green leafy vegetables. *Journal of the Science of Food Agriculture*, v. 86, n. 3, p. 2147-2152, 2006.
- HARVEY, L. Mineral bioavailability. *The Journal of Nutrition*, v. 31, n. 4, p. 179-182, 2001.
- HUNT, C. D.; JOHNSON, L. Magnesium requirements: new estimations for men and women by cross-sectional statistical analyses of metabolic magnesium balance data. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 84, n. 2, p. 843-852, 2006.
- KAHYAOGLU, T.; KAYA, S. Determination of optimum processing conditions for hot-air roasting of hulled sesame seeds using response surface methodology. *Journal of the Science of Food Agriculture*, v. 86, n. 4, p. 1452-1459, 2006.
- LUTEN, J. et al. Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron dialysability from food. *Journal of the Science of Food Agriculture*, v. 72, n. 4, p. 415-424, 1996.
- MA, G. et al. Phytate, Calcium, Iron, and Zinc Contents and Their Molar Ratios in Foods Commonly Consumed in China. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 53, n. 3, p. 10285-10290, 2005.
- MILLER, D. D. et al. An In vitro method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 34, n. 1, p. 2248-2256, 1981.
- NARASINGA RAO, B. S. Methods for the Determination of Bioavailability of Trace Metals: A Critical Evaluation. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 31, n. 5, p. 353-361, 1994.
- OLIVEIRA, M. A. A.; OSÓRIO, M. M. Consumo de leite de vaca e anemia ferropriva na infância. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 81, n. 4, p. 361-366, 2005.
- PALLARÉS, I. F. Effect of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *British Journal of Nutrition*, v. 70, n. 1, p. 609-620, 1993.
- PERALES, S. et al. Bioavailability of zinc from infants foods by in vitro methods (solubility, dialyzability and uptake and transport by Caco-2 cells). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 86, n. 2, p. 971-978, 2006.
- PERALES, S. et al. Fortification of Milk with Calcium: Effect on Calcium Bioavailability and Interactions with Iron and Zinc. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 54, n. 3, p. 4901-4906, 2006.
- PORRES, J. M. et al. Effect of Natural and Controlled Fermentation on Chemical Composition and Nutrient Dialyzability from Beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 51, n. 4, p. 5144-5149, 2003.
- PROULX, A. K.; REDDY, M. B. Iron Bioavailability of Hemoglobin from Soy Root Nodules Using a Caco-2 Cell Culture Model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 54, n. 1, p. 518-522, 2006.
- PUSHPANJALI, R. P.; KHOKHAR, S. In vitro availability of iron and zinc from some Indian vegetarian diets: correlations with dietary fibre and phytate. *Food Chemistry*, v. 56, n. 2, p. 111-114, 1996.
- REDDY, M. B.; HURREL, R. F.; COOK, J. D. Meat Consumption in a varied Diet Marginally Influences Nonheme Iron Absorption in Normal Individuals. *The Journal of Nutrition*, v. 136, n. 1, p. 576-581, 2006.
- REEVES, P. G; NIELSEN, F. H; FAHEY Jr., G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of

- the AIN-76. A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 3, p. 1939-1951, 1993.
- RODRIGUES, J. N.; GIOIELLI, L. A.; ANTON, C. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos de misturas de gordura do leite e óleo de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 226-231, 2003.
- SLAVIN, J. L.; GREENBERG, N. A. Partially hydrolyzed guar gum: clinical nutrition uses. **Nutrition Research**, v. 19, n. 6, p. 549-552, 2003.
- SOLOMONS, N. W.; RUZ, M. Zinc and iron interaction: concepts and perspectives in the developing world. **Nutrition Research**, v. 17, n. 1, p. 177-185, 1997.
- SPAPEN, H. et al. Soluble fiber reduces the incidence of diarrhea in septic patients receiving total enteral nutrition: a prospective, double-blind, randomized, and controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 20, n. 4, p. 301-305, 2001.
- STATISTIC. Statistical Analysis System Institute Incorporation. **Statistic/Graphics Statistic software**: usage and reference. Tulsa, 1998 (version 6).
- TOBA, Y. et al. Comparison of the effects of milk components and calcium source on calcium bioavailability in growing male rats. **Nutrition Research**, v. 19, n. 3, p. 449-459, 1999.
- TORRE, M.; RODRIGUEZ, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary and phytic acid on mineral availability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 1-22, 1991.
- TORRE, M.; RODRIGUEZ, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Interactions of Fe(II), Ca(II) and Fe(III) with high dietary fibre materials: a physicochemical approach. **Food Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 23-31, 1995.
- TSO, P.; LEE, T.; DEMICHELE, S. J. Lymphatic absorption of structured triglycerides vs. physical mix in a rat model of fat malabsorption. **The American Physiological Society**, v. 277, n. 2, p. 333-340, 1999.
- VELÁZQUEZ, M. et al. Effect of oligosaccharides and fiber substitutes on short-chain fatty acid production by human faecal microflora. **Anaerobe**, v. 1, n. 6, p. 87-93, 2001.
- WINICHAGOON, P. et al. A Multimicronutrient-Fortified Seasoning Powder Enhances the Hemoglobin, Zinc, and Iodine Status of primary School Children in North East Thailand: A Randomized Controlled Trial of Efficacy. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 3, p. 1617-1623, 2006.
- YANG, G. et al. Application of dietary fiber in clinical enteral nutrition: A meta-analysis of randomized controlled trials. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 3, p. 3935-3938, 2005.
- ZIMMERMANN, M. B. et al. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 580-586, 2006.