

1 INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento químico que apresenta papel importante no transporte respiratório do oxigênio e dióxido de carbono, e nas enzimas envolvidas no processo de respiração celular. No organismo os problemas relacionados ao ferro são referentes à deficiência ou excesso. Destes, os mais importantes, devido à incidência, são a deficiência e a anemia por deficiência de ferro (anemia ferropriva), constituindo-se em um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e são decorrentes, principalmente, da ingestão inadequada de ferro. O ferro é denominado heme, quando está ligado ao anel porfirínico na molécula de hemoglobina; e não heme quando esta ligação não ocorre. O ferro heme presente nos alimentos apresenta uma maior biodisponibilidade quando comparado ao não heme. Para o tratamento ou prevenção da deficiência de ferro, estão disponíveis diversas substâncias contendo ferro não heme como: sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso, fumarato ferroso, succinato ferroso, ferro elementar, EDTA férrico, ferro glicina, etc. O sulfato ferroso é a substância (padrão) mais comumente utilizada na prevenção e tratamento da deficiência e/ou anemia ferropriva por apresentar alta biodisponibilidade e baixo

custo. Entretanto pode apresentar efeitos adversos tais como dor abdominal, diarreia, vômitos e constipação que ocasionam o abandono do tratamento. O desenvolvimento de novas substâncias, contendo ferro, que eliminem ou amenizem os efeitos colaterais decorrentes da administração de sulfato ferroso é importante para os programas de prevenção e tratamento da deficiência de ferro ou da anemia ferropriva. Neste sentido, foi estudado o complexo ferro-peptídeo que se apresenta como uma possível alternativa ao sulfato ferroso.

Baseado nas características apresentadas pelo complexo ferro-peptídeo, nos aumentos das ferremias (teores de ferro sérico ligado a apotransferrina) que ocorrem, em seres humanos, durante o período diurno observados por Wiltink et al. (1973) e no estudo realizado em ratos, por Dutra-de-Oliveira et al. (1995) comprovando resultados similares entre o sulfato ferroso e os complexos ferro-glicina e EDTA férrico, as hipóteses do presente estudo, quando o complexo ferro-peptídeo é administrado por via oral, em homens saudáveis, foram: 1) induz aumentos significativos das ferremias quando comparados com os aumentos das ferremias controle (C), determinados sem a administração de ferro; 2) induz aumentos significativos iguais ou superiores aos determinados após a administração de sulfato ferroso utilizado como referência.

Portanto, com o objetivo de testar as hipóteses, foram determinados os aumentos das ferremias verificados sem a administração prévia de ferro e após as administrações de complexo ferro-peptídeo e o sulfato ferroso, em homens saudáveis, por via oral, e comparados nos respectivos tempos.

1.1 Complexo ferro-peptídeo: uma fonte alternativa de ferro

O complexo ferro-peptídeo desenvolvido por Freitas et al. (1993) apresenta características físico-químicas que contrastam com aquelas apresentadas pelo sulfato ferroso, isto é, baixa solubilidade em pH ácido, totalmente solúvel em pH neutro a alcalino, sendo que, na faixa de pH de 2 – 7,5, o ferro permanece na forma complexada. No entanto, em pH 5,0, o ferro do complexo ferro-peptídeo pode ser mobilizado por ligantes de baixo peso molecular (p. ex., cisteína), sugerindo que o ferro do complexo possa ser mobilizado por compostos transferrina-símiles, presentes no trato gastrointestinal (Chaud, 1993). Por outro lado, em estudos *in vivo* a administração do complexo ferro-peptídeo, por sonda gástrica, em ratos após jejum de 18 horas resultou em aumento e manutenção dos níveis séricos de ferro elementar maior do que aqueles observados para a dose equivalente de sulfato ferroso. Além disso, a bioutilização deste composto em ensaios de repleção de hemoglobina em ratos anêmicos foi semelhante àquela observada para o sulfato ferroso (Chaud et al., 2002). Também foi realizado estudo em crianças em idades pré-escolares, não anêmicas, onde se observou que a suplementação medicamentosa com o complexo ferro-peptídeo foi tão eficaz quanto o sulfato ferroso ou NaFe EDTA na prevenção da anemia, sendo que todas as fontes de ferro foram veiculadas em água (Freitas, 1996), foi observado ainda que os efeitos colaterais provocados pelo complexo ferro-peptídeo foram reduzidos quando comparados com o sulfato ferroso.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Deficiência de ferro e anemia ferropriva

A deficiência de ferro e a anemia por deficiência de ferro (anemia ferropriva) estão incluídas entre os maiores problemas de saúde pública no mundo, ocorrendo tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos (Stoltzfus & Dreyfuss, 1998; WHO/UNU/UNICEF, 1993), e decorrentes, principalmente, da ingestão de dietas não balanceadas ou da baixa biodisponibilidade do ferro ingerido (Finch & Cook, 1984). A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1992; WHO, 1998; INACG, 2000) estima em aproximadamente 2 bilhões o número de pessoas anêmicas ou deficientes em ferro sendo que em países em desenvolvimento verifica-se uma alta proporção entre 30 a 70% da população e em países industrializados da Europa e da América do Norte menor que 20% (Hallberg, 1995; Looker et al., 1997). Embora a deficiência em ferro possa ocorrer em todas as idades, do ponto de vista fisiológico, os seus efeitos podem variar de acordo com a etapa de desenvolvimento e taxa de

utilização de ferro pelo indivíduo (Darnton-Hill, 1997). Os segmentos da população mais vulneráveis são as crianças, principalmente lactentes e pré-escolares, e as mulheres grávidas (WHO, 1992; Yip, 1997; Yip & Ramakrishnan, 2002). A carência de ferro provoca alterações na função imunológica, (Walter et al., 1997); diminuição no crescimento e desenvolvimento físico (Beard et al., 1996; Andraca et al., 1997); alteração das funções hormonais (Dallman, 1986) e enzimáticas (Boldt, 1999; Conrad et al., 1999), fadiga (Haas & Brownline, 2001), deficiência no desenvolvimento mental (Beard et al., 1993) e no desempenho escolar das crianças e um aumento na morbidade (Cunha & Cunha, 1998).

A deficiência de ferro durante a gravidez está associada ao aumento do risco de morbidade e mortalidade materna e fetal, parto prematuro e baixo peso (Lieberman et al., 1988; Allen, 1997; Preziosi et al., 1997; Rasmussen, 2001). Em crianças, especialmente no 3º ano de idade o ferro é fator crítico para o desenvolvimento do cérebro (Hunt, 2002), a deficiência de ferro pode limitar o desenvolvimento mental de maneira significativa e até mesmo irreversível (Lozoff et al., 1991; Beard et al., 1993; Sheard, 1994; Pollitt, 1997; Lozoff et al., 1998).

Na população adulta, a deficiência de ferro pode, ainda, reduzir o desempenho em tarefas que dependam da resistência física, diminuindo a capacidade produtiva da população (Haas & Brownline, 2001), o que é uma consequência grave, do ponto de vista sócio-econômico, altamente prejudiciais individualmente e coletivamente (Hunt, 2002).

A deficiência de ferro afeta a vida de mais de 50% das mulheres em idade reprodutiva e de adolescentes. Cerca de 3/4 da deficiência de ferro na população

mundial ocorre na Ásia onde 60% das mulheres em idade reprodutiva e 40–50% de crianças pré-escolares e de 1º grau são deficientes em ferro (Hunt, 2002). Na América Latina, 10-30% das mulheres em idade reprodutiva e até 40-70% das mulheres grávidas são deficientes em ferro (Lopes-Alegria et al., 1989).

No Brasil alguns estudos demonstram prevalência de anemia em aproximadamente 50% de crianças em idade pré-escolar de nível sócio-econômico mais baixo nas cidades de Porto Alegre/RS (Silva et al., 2001) e em São Paulo/SP (Monteiro et al., 2000). No entanto, a prevalência real em crianças e lactentes é muito difícil de ser determinado devido a problemas no delineamento da pesquisa, na coleta de dados e tamanho da amostra (Szarfacs & De Souza, 1997). A nível mundial, foram realizadas numerosas intervenções com diferentes resultados, indicando que, em quase todas as situações, é possível prevenir a deficiência de ferro e suas conseqüências (Freire, 1989; WHO, 1998).

Devido à freqüência, à gravidade da anemia ferropriva e aos efeitos colaterais observados após a administração de doses terapêuticas de sulfato ferroso (FeSO_4), recomenda-se que sejam desenvolvidas novas estratégias (Hurrell, 1997; Gibson, 1997; Freire, 1997); sistemas de liberação (Cook et al., 1990; Batra et al., 1994) ou novos compostos (Simpson et al., 1991; Cremonesi & Caramazza, 1993; Iost et al., 1998), que possam minimizar ou eliminar os efeitos colaterais, da administração de ferro.

Essas alternativas, como conseqüências poderão resultar em aumento da aderência ao tratamento e da eficácia dos programas de combate à anemia (Simmons et al., 1993; Singh et al., 1998; Haliotis & Papanastasiou, 1998).

2.2 Funções do ferro

O ferro é um dos metais mais abundantes no corpo humano, essencial à saúde humana, apresenta peso atômico de 55,847. As funções do ferro são decorrentes de suas propriedades físicas e químicas, principalmente devido a facilidade de participar de reações de oxi-redução (Baynes et al., 2000). Quando livre no organismo reage com o oxigênio para formar intermediários capazes de danificar as membranas celulares e alterar o DNA, portanto precisa estar firmemente ligado as proteínas para prevenir seus efeitos.

O ferro está presente no organismo em maior quantidade na forma heme na hemoglobina das hemácias, onde apresenta um papel importante no transporte respiratório do oxigênio e dióxido de carbono e nas enzimas envolvidas no processo de respiração celular. Nos músculos a forma heme está presente na mioglobina, servindo como reserva de oxigênio. Nas células dentro das mitocôndrias está presente em muitas enzimas responsáveis pela produção oxidativa de ATP (Baynes et al., 2000). É essencial para o funcionamento do sistema imunológico, síntese e funcionamento de neurotransmissores (Beard et al., 1993). O ferro não funcional está armazenado no fígado, no baço ou na medula óssea.

A carência de ferro pode resultar em anemia ferropriva e a perda parcial da atividade das enzimas dependentes. O excesso pode provocar danos principalmente relacionado a oxidação, resultando na formação de radicais livres capazes de provocar doenças degenerativas, cirrose hepática, diabetes, doenças cardiovasculares,

etc. (Sofic et al., 1988; Dexter et al., 1991; Jenner, 1991; Connor et al., 1992; Smith et al., 1992).

2.3 Absorção do ferro

A absorção de uma substância ou elemento químico pelo organismo, quando administrado por via oral, ocorre apenas após serem dissolvidas. A dissolução está relacionada diretamente com as características do meio líquido em que se encontra, com o volume, presença de outros compostos, polaridades, pH, etc. Além disso depende também do tempo em que permanece em contato com o líquido e das características da substância, como o tamanho das partículas, estado amorfo ou cristalino, etc.

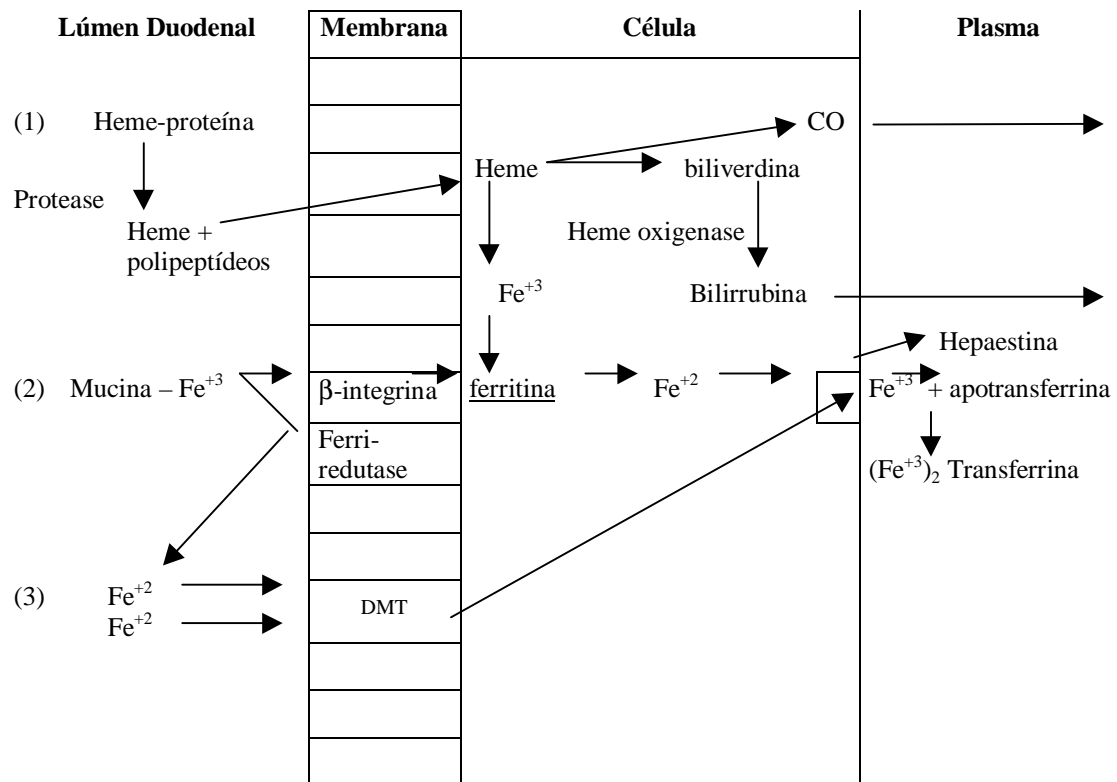
A passagem de nutrientes do lúmen gastrointestinal para a circulação ocorre pelos seguintes mecanismos: atravessando a célula epitelial (mecanismo transepitelial), passando entre as células epiteliais (permeação paracelular) e englobando os nutrientes na membrana celular (pinocitose). O transporte pode ocorrer sem gasto energético (difusão) ou com gasto energético (ativo). Outro fator regulador é um ou mais transportador (carreador), para transpor a membrana celular, nesse caso haverá uma limitação da velocidade absorptiva por saturação dos

transportadores, e competitividade entre nutrientes que são absorvidos com o auxílio do mesmo transportador (Angelis, 1998).

A absorção do ferro pelo organismo ocorre na porção proximal do intestino delgado, especificamente no duodeno e jejuno (Cook et al., 1991), está diretamente relacionada à forma em que se encontra, isto é, forma heme (ligado à proteína heme) e não heme; à solubilidade e à presença de outros componentes.

O ferro heme é melhor absorvido e penetra intacto no enterócito como metaloporfirina através dos poros da membrana celular (Conrad et al., 1966; Hallberg & Sölvell, 1967). A absorção ocorre após a digestão proteolítica da mioglobina e da hemoglobina (Uzel & Conrad, 1998), no citosol o ferro inorgânico na forma férrica é liberado do anel porfirínico pela heme-oxigenase (Raffin et al., 1974; Böni et al., 1993), enzima com elevada atividade nas células da mucosa do duodeno (Conrad et al., 1966; Wheby et al., 1970). A sua inibição, bloqueia a absorção do ferro heme (Böni et al., 1993). Em seguida liga-se a apoferritina para formar o complexo denominado ferritina, posteriormente é liberado na forma ferrosa para ligar-se à hepaestina e finalmente ser liberado no plasma na forma férrica, para se ligar à apotransferrina (Wessling-Resnick, 2000). Os mecanismos transepiteliais de absorção do ferro estão esquematicamente ilustradas na Figura 1 (Fairbanks & Beutler, 2001). Os fatores que alteram a absorção do ferro inorgânico como a inibição provocada por fitatos, carbonatos, oxalatos, fosfatos e taninos (Benjamin et al., 1967) ou aumento provocado pelo ácido ascórbico (Callender et al., 1957) não influenciam na absorção do ferro heme. O aumento na absorção do ferro heme é verificado na deficiência de ferro (Young et al., 1989).

Figura 1 – Mecanismo de absorção do ferro



O ferro heme é absorvido na forma férrica (Fe^{+3}) ligado à mucina (Conrad et al., 1999) ou à apotransferrina ou na forma ferrosa (Fe^{+2}) ligando-se ao transportador de metais divalentes (DMT) presente em altas concentrações no duodeno (Fleming et al., 1997), a via caracterizada por este transportador representa a de maior absorção de ferro não heme (Sharp et al., 2002).

A penetração nos enterócitos do ferro complexado à mucina (mucina - Fe^{+3}) é mediada pela via β integrina da parede celular, no interior da célula segue a mesma seqüência do ferro liberado do heme.

A forma férrica insolúvel em pH acima de 3 pode ser reduzida à forma ferrosa pela enzima ferreredutase presente na parede da mucosa intestinal (Riedel et al., 1995) para ser absorvido pela via que utiliza o transportador de cátion divalente. Esta via não é exclusiva para o ferro e a presença de outros metais divalentes como o cálcio pode reduzir a absorção por competitividade (Angelis, 1998).

O ferro é absorvido também por meio da ligação à apotransferrina, secretada pelo fígado na bile e liberada no intestino delgado. A apotransferrina liga-se ao ferro livre formando a transferrina que por sua vez liga-se aos receptores das células epiteliais intestinais e em seguida, por pinocitose é absorvida e liberada posteriormente na forma de apotransferrina para o sangue (Guyton & Hall, 1997) ou retorna ao lúmen intestinal (Thorstensenk & Rosmlo, 1990). Quando o organismo apresenta depósitos excessivos de ferro, o fígado reduz a produção de apotransferrina, portanto diminui a concentração no plasma e na bile, deprimindo a absorção (Guyton & Hall, 1997), a depressão provavelmente não deve ser total (Wheby & Umpierre, 1964). A quantidade de ferritina nas células da mucosa

intestinal, também pode controlar a absorção de ferro quando está elevada podendo bloquear a transferrina (Pietrangelo et al., 1992)

A absorção do ferro pode ocorrer por difusão passiva (permeação) e depende da diferença de concentração do ferro existente no lúmen intestinal e no plasma. Esse mecanismo não é regulado pelo organismo. Não sendo ainda estabelecido o quanto representa no processo de absorção.

2.4 Recomendações diárias de Ferro

O ferro ao contrário de outros minerais traços é mantido ou regulado em indivíduos adultos pela quantidade absorvida que é aproximadamente igual à perda (Hallberg & Hulthen, 2000), conforme Tabela 1 (WHO/UNU/UNICEF, 2001). Para a manutenção do equilíbrio as quantidades diárias necessárias em indivíduos não deficientes variam de acordo com a idade e o sexo conforme Tabela 2 (Subcommittee in the tenth edition of the Rdas Fnb, 1989).

Tabela 1 – Quantidade de ferro necessária para o crescimento e perdida por dia

Grupo	Idade (anos)	Média de peso corporal (kg)	Quantidade necessária para o crescimento (mg/dia)	Média de ferro perdido (mg/dia)	
				Basal	Menstruação
	0,5-1	9,0	0,55	0,17	
Crianças	1-3	13,3	0,27	0,19	
	4-6	19,2	0,23	0,27	
	7-10	28,1	0,32	0,39	
	11-14	45,0	0,55	0,62	
Homens	15-17	64,4	0,60	0,90	
	> 18	75,0		1,05	
	11-14*	46,1	0,55	0,65	
Mulheres	11-14	46,1	0,55	0,65	0,48
	15-17	56,4	0,35	0,79	0,48
	> 18	62,0		0,87	0,48
Pós menopausa		62,0		0,87	
Lactante		62,0		1,15	

* não menstruando

Tabela 2 – Recomendações diárias de ferro de acordo com a idade e o sexo

Idade e Sexo		Recomendação diária (mg)
Crianças	6 – 11 meses	6
Crianças	1 – 2 anos	10
Mulheres	14 – 30 anos	15
Mulheres (gestantes)		30
Mulheres (lactantes)		15
Mulheres	60 – 65 anos	10
Homens	> 12 anos	12

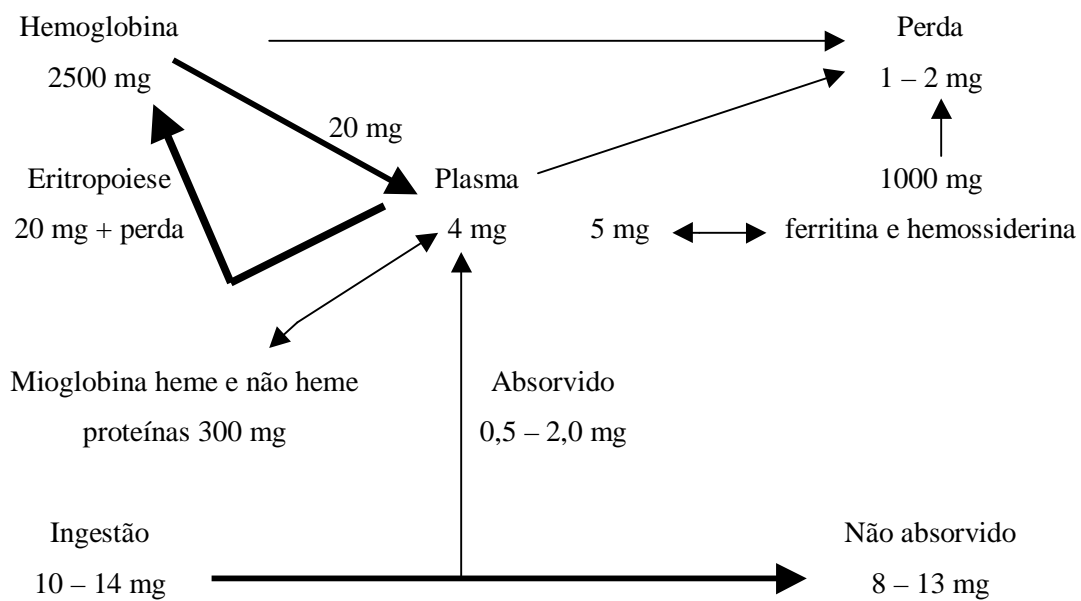
2.5 Distribuição do ferro no organismo

A concentração de ferro no organismo é aproximadamente 35 a 45 mg/Kg de peso corporal no adulto (Andrews, 1999).

As concentrações variam em função da idade, sexo e tecido ou órgãos examinado (Bothwell et al., 1979).

A Figura 2 demonstra a variação das quantidades de ferro nos diversos compartimentos do organismo do homem normal (Finch et al., 1970).

Figura 2 – Distribuição de ferro e a relação entre os compartimentos no organismo



A maior quantidade de ferro, cerca de 60 – 70%, está presente na hemoglobina em circulação nos eritrócitos (Bothwell et al., 1979; Conrad et al., 1999), sendo que 20 – 30% do ferro estocado está na forma de ferritina (Conrad et al., 1999). Esta se constitui na principal forma de estocagem do ferro sendo que aproximadamente 60% encontra-se no fígado e o restante 40% nos músculos, células do sistema retículo endotelial e fluídos. No plasma está presente em diminuta quantidade e a sua concentração está relacionada aos estoques de ferro no organismo (Cook et al., 1974). A determinação da ferritina sérica constitui-se em importante medida no diagnóstico de desordens do metabolismo do ferro. Apenas 5% do estoque de ferro do fígado é constituído de hemossiderina, na sobrecarga esse percentual pode aumentar até 10 vezes (Green et al., 1968). A hemossiderina encontra-se predominantemente nos macrófagos (Fairbanks & Beutler, 2001).

Menos que 1% do ferro está ligado à apotransferrina, proteína plasmática que apresenta dois locais de ligação do ferro férrico (Fe^{+3}), para formar a transferrina. Essa proteína é responsável pelo transporte do ferro entre os diversos compartimentos e para a síntese da hemoglobina presente nos eritrócitos (Conrad et al., 1999). Aproximadamente 20 mg de ferro diariamente são utilizados para a produção de hemoglobina e são reciclados à partir da destruição dos eritrócitos cuja vida média é de 120 dias, quando são fagocitadas pelos macrófagos do sistema retículo endotelial (Finch et al., 1970).

A ferritina juntamente com hemossiderina representam os estoques de ferro do corpo humano, são considerados normais para homens os níveis, entre 40 – 340 ng/mL (Hoffbrand et al., 2001).

A ferritina e a transferrina presentes nas células absorptivas da mucosa intestinal, participam da absorção do ferro, sendo este um dos mecanismos controlado fisiologicamente. Quando os estoques corporais de ferro estão elevados, o conteúdo de ferritina do epitélio da mucosa também está elevado e da transferrina está baixo. Na deficiência de ferro ocorre o contrário (El-Shobaki & Rummel, 1977; Savin & Cook, 1980; Sheehan & Frenkel, 1972; Taylor et al., 1988). Esse mecanismo é regulado pela expressão gênica de RNA mensageiro (mRNA) (Ponka et al., 1998; Philpott, 2002).

2.6 Sulfato ferroso

O sulfato ferroso na forma anidra é uma substância com fórmula molecular FeSO_4 e peso molecular de 151,91, contém 36,76% de ferro. Comercialmente estão disponíveis nas formas monohidratada ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), bihidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e na forma heptahidratada ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), correspondente a 32,87% p/p, 29,79% p/p e 20,09% p/p de ferro respectivamente.

As formas hidratadas são solúveis em soluções ácidas. Apresentam cor acastanhada ou esverdeada, sabor metálico e odor irritante.

Em presença de hidróxido forma precipitados, em solução aquosa apresenta pH entre 3,0 e 4,0 (Budavari, 1996). É a substância mais utilizada na forma de

comprimidos, gotas e drágeas no tratamento e prevenção da deficiência de ferro ou anemia ferropriva, devido ao baixo custo e elevada biodisponibilidade frente à outras fontes de ferro. Em doses elevadas pode causar problemas de intoxicação, sendo o envenenamento acidental o mais comum em crianças, devido à ingestão excessiva de comprimidos de sulfato ferroso (Anderson, 1994).

Quando administrado por via oral apresenta, em doses terapêuticas efeitos adversos no estômago, como dores abdominais e irritação gástrica (Kerr & Davidson, 1958; Böni et al., 1993). Apenas 10 a 20% do ferro administrado na forma de sulfato ferroso é absorvido (Reynold, 1989), o ferro não absorvido pode causar diarreia, constipação, modificações da flora fecal (Benoni et al., 1993) e ainda causar conforme demonstrado em ratos por Benoni et al. (1993) necrose em células da mucosa intestinal.

Como especialidade farmacêutica está disponível comercialmente na forma de comprimidos sem ou com revestimento (drágeas), contendo 135, 200, 250 ou 300mg de sulfato ferroso bihidratado, correspondendo a aproximadamente 40, 60, 75, 90 mg de ferro respectivamente. As drágeas são as formas preferidas por eliminarem o sabor desagradável da substância, alternativamente podem ser preparadas na forma de cápsulas. Em solução, para administração oral, estão disponíveis em concentrações que variam de 20 a 35 mg/mL (Korolkovas & França, 2002).

2.7 Compostos alternativos ao sulfato ferroso, disponíveis atualmente

Diversas substâncias estão disponíveis para o tratamento e prevenção da deficiência de ferro e da anemia ferropriva como alternativas ao sulfato ferroso. Esses compostos apresentam como desvantagens, em geral, um custo mais elevado e/ou uma biodisponibilidade menor quando comparado ao sulfato ferroso (Hurrell, 2002) Tabela 3.

Apresentam, exceto ao NaFeEDTA, efeitos adversos similares ao sulfato ferroso. Esse composto sofre dissociação no intestino delgado, e o ferro liberado é absorvido pelas vias usuais de absorção de ferro não heme (Dawson et al., 1998), menos que 1% é absorvido na forma intacta; e, presumivelmente, excretado na urina complexado com outros metais, o restante é excretado pelo intestino. O NaFeEDTA ainda não é utilizado para tratamento da anemia e está restrito à fortificação de alimentos, por não estar esclarecido o efeito da administração de doses terapêuticas desse composto sobre o balanço de zinco e outros metais divalentes no homem, porém a grande desvantagem é o alto custo, aproximadamente 6 vezes maior que o sulfato ferroso (Hurrell, 2002).

Tabela 3 – Características das diferentes fontes de ferro

	Conteúdo aproximado de ferro (%)	Biodisponibilidade relativa		Custo aproximado relativo
		Ratos	Homens	
Livremente solúvel em água				
Sulfato ferroso 7H ₂ O	20	100	100	1,0
Sulfato ferroso dessecado	33	100	100	0,7
Gluconato ferroso	12	97	89	5,1
Lactato ferroso	19	-	106	4,1
Citrato férrico de amônio	18	107	-	2,1
Pouco solúvel em água/solúvel em ácidos diluídos				
Fumarato ferroso	33	95	100	1,3
Succinato ferroso	35	119	92	4,1
Sacarato férrico	10	92	74	5,2
Insolúvel em água/pouco solúvel em ácidos diluídos				
Ortofosfato férrico	28	6-46	25-32	4,1
Ortofosfato de amônia férrico	19	-	30-60	-
Pirofosfato férrico	25	45-58	21-74	2,3
Ferro elementar em pó - eletrólito	98	44-48	5-100	0,5
- carbonil	98	39-66	5-20	1,0
- reduzido	97	24-54	13-148	0,2
Compostos protegidos				
NaFe EDTA	14	-	28-416	6,0

Outros compostos sintéticos são os quelatos biglicinato ferroso, ferromaltose e ferriprotinato. O quelato biglicinato ferroso é o aminoquelato de ferro, obtido pela reação de glicina com Fe^{+2} . Este composto apresenta a mesma biodisponibilidade que o sulfato ferroso (Fox et al., 1998), no trato gastrointestinal aparentemente não sofre hidrólise, é dissociado no intestino e absorvido pela mesma via de outras formas de ferro não heme (Dawson et al., 1998). Uma vez dentro da célula, o ferro deve ser liberado e transferido para outras proteínas. O aminoquelato de ferro apresenta menores efeitos colaterais que o sulfato ferroso (Coplin et al., 1991; Jeppesen & Borzelleca, 1999) e, possivelmente não apresenta, as reações colaterais de quelação do NaFeEDTA com outros metais. A absorção do ferro do quelato é limitada por mecanismos de controle fisiológico (Jeppesen & Borzelleca, 1999). Este composto, embora disponível para a fortificação de alimentos, está em avaliação em ensaios clínicos (Layrisse & Garcia-Casal, 1997), Dutra-de-Oliveira et al. (1995) verificaram que o NaFeEDTA e FeGly_2 apresentaram biodisponibilidade similares quando administrados em ratos. Dessa forma, os compostos quelados ou complexados com ferro apresentam grande potencial de utilização na terapia ou prevenção da deficiência de ferro (Pineda & Ashmed, 2001).

O ferromaltose é um complexo de hidróxido férrico e isomaltose, contém 30% p/p de ferro elementar e o ferriprotinato é um complexo ferro-proteico obtido por succinilação da caseína e adição de ferro por meio da reação com sal férrico, contém 5% p/p \pm 0,2% de ferro trivalente (Korolkovas & França, 2002).

Uma abordagem racional para o desenvolvimento deste tipo de composto deve preencher alguns requisitos tais como: (a) o composto deve se ligar ao ferro de

forma a permitir sua transferência para outros ligantes presentes na membrana e/ou citosol do enterócito; (b) o composto deve se ligar ao ferro de maneira a evitar sua liberação em sítios onde ele possa agir formando radicais livres; e (c) o composto deve apresentar alta solubilidade nos locais onde ocorre a absorção (Cremonesi & Caramazza, 1993).

2.8 Complexo Ferro-peptídeo

O complexo ferro-peptídeo é um composto obtido à partir da reação entre o hidrolisado de caseína e o cloreto férrico, com teor de ferro aproximado de 5% p/p. Apresenta cor acastanhada e odor característico dos hidrolisados proteicos, é insolúvel em soluções aquosas ácidas e solúvel em pH neutro ou levemente alcalino.

O composto apresenta o ferro ligado em maior extensão à carboxila e em menor ao nitrogênio do grupamento amina dos peptídeos e aminoácidos do hidrolisado de caseína (Chaud, 1993). É um composto que apresenta características organolépticas desagradáveis, devendo por esta razão, ser preparado na forma de comprimidos revestidos ou cápsulas.

2.9 Cápsulas gelatinosas duras

As cápsulas gelatinosas duras, são invólucros constituídos de gelatina, destinadas à conterem medicamentos na forma de pó para a administração oral. Apresentam capacidades que variam de 0,13 a 1,37 mL. Possibilitam a preparação de doses uniformes, protegem a substância da ação da luz do ar e da umidade. Facilitam a administração de fármacos que apresentam odor e sabor desagradáveis (Prista et al., 1991). Os medicamentos na forma de cápsula devem ser ingeridos com o auxílio de água para que as cápsulas sejam desintegradas e os fármacos liberados em pouco tempo no estômago. Para se comprovar a desintegração e o tempo que as cápsulas se desintegram utiliza-se o teste especificado pela legislação (Farmacopéia Brasileira, 1988).

2.10 Ferremia, capacidade de ligação de ferro e capacidade total de ligação de ferro

A ferremia refere-se à concentração de ferro na forma férrica (Fe^{+3}) ligada à apotransferrina presente no soro. O complexo Fe^{+3} – apotransferrina formado denomina-se transferrina. Os valores da ferremia não incluem o ferro heme, presente

na hemoglobina. Normalmente apenas 1/3 dos sítios de ligação para o ferro da transferrina estão ocupados pelo Fe^{+3} , havendo portanto uma considerável reserva de capacidade ligante do ferro, chamada capacidade não saturada de ligação de ferro no soro (UIBC, em inglês, unsaturated iron-binding capacity).

A ferremia somada à UIBC resulta na capacidade total de ligação do ferro (TIBC, em inglês, total iron-binding capacity). A TIBC no soro conseqüentemente mede a concentração máxima de ferro que as proteínas do soro, principalmente a apotransferrina, podem armazenar. A TIBC encontra-se freqüentemente aumentada na deficiência de ferro e diminuída em distúrbios inflamatórios e na hemocromatose (Fairbanks & Klee, 1998). Wheby & Umpierre (1964) demonstraram em estudos realizados em humanos que a absorção de ferro continua apesar da completa saturação da transferrina após a administração de citrato ferroso por via oral, esses resultados podem sugerir comportamento semelhante quando se administra o sulfato ferroso, fato que torna potencialmente perigosa, quando não monitorada a sua utilização em programas de prevenção em massa da deficiência de ferro ou da anemia ferropriva.

A ferremia e o TIBC eram utilizados para o diagnóstico da deficiência, entretanto a determinação da concentração da ferritina sérica é o mais sensível e fidedigno método para demonstrar este distúrbio (Fairbanks & Klee, 1998; Hallberg et al., 2000), superior à determinação do eritrócito zinco protoporfirina por não ser específica (Fairbanks & Beutler, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

3.1.1 Determinar e comparar os aumentos das ferremias em homens saudáveis, após as administrações por via oral, de ferro nas formas de complexo ferro-peptídeo e de sulfato ferroso (como referência); e sem a administração de ferro (como controle).

3.2 Específicos

3.2.1 Comparar os aumentos das ferremias, determinados após as administrações de 60 mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, por via oral, em homens

saudáveis em jejum, com os aumentos determinados sem a administração de ferro nos respectivos tempos.

3.2.2 Comparar os aumentos das ferremias, determinados após as administrações de 80 mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, por via oral, em homens saudáveis em jejum, com os aumentos determinados sem a administração de ferro nos respectivos tempos.

3.2.3 Comparar os aumentos das ferremias, determinados após as administrações de 60 mg de ferro na forma de complexo ferro-peptídeo, por via oral, em homens saudáveis, recebendo dieta (ANEXO A) durante e após a administração, com os aumentos determinados sem a administração de ferro nos respectivos tempos.

3.2.4 Comparar os aumentos das ferremias, determinados após as administrações de 60 mg de ferro, na forma sulfato ferroso, por via oral, em homens saudáveis em jejum, com os aumentos determinados sem a administração de ferro nos respectivos tempos.

3.2.5 Comparar os aumentos das ferremias, determinados após as administrações de 60 mg de ferro, nas formas de sulfato ferroso e de complexo ferro-peptídeo, por via oral, em homens saudáveis, em jejum, nos respectivos tempos.

3.2.6 Comparar os aumentos das ferremias, determinados após as administrações de 60 mg de ferro, na forma de sulfato ferroso e de 80 mg, na forma de complexo ferro-peptídeo, por via oral, em homens saudáveis, em jejum, nos respectivos tempos.

3.2.7 Comparar os aumentos das ferremias, determinados após as administrações de 60 mg de ferro, nas formas de sulfato ferroso e de complexo ferro-peptídeo, por via oral, em homens saudáveis recebendo dieta durante e após as administrações, nos respectivos tempos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 População analisada

O estudo foi realizado em 10 voluntários saudáveis, do sexo masculino com idade entre 21 a 43 anos, com índice de massa corporal entre 20 e 25 Kg/m². Todos foram submetidos a exames físicos de rotina, antropométricos, hematológicos, parasitológicos e bioquímicos para ferro sérico, ferritina sérica, glicemia, com o objetivo de assegurar a ausência de fatores fisiológicos e patológicos que influenciam na absorção do ferro. Todos os indivíduos participaram das diferentes fases do estudo sendo, portanto considerados controles de si próprio.

4.1.1.1 Critérios de exclusão para os voluntários

Foram excluídos os voluntários que apresentaram:

- Atividade física intensa acima de 2 horas/dia;
- Diarréia;
- Uso de medicamentos;
- Doenças envolvendo o estômago, o pâncreas, o intestino, o fígado e as vias biliares;
- Intenção de doar sangue durante o período do estudo;
- Níveis hematimétricos (hemoglobina, hematócrito, glóbulos vermelhos) abaixo dos valores normais;
- Microcitose e hipocromia;
- Parasitose intestinal;
- Diabetes *mellitus*;
- Hipertensão arterial;
- Insuficiência renal;
- Obesidade;
- Desnutrição;
- Tabagismo;
- Alcoolismo.

4.1.1.2 Critérios de inclusão para os voluntários

Foram incluídos no estudo os voluntários que apresentaram

- Sexo masculino;
- Idade entre 21 a 50 anos;
- Índice de massa corpórea (IMC): relação peso/altura² (Heymsfield et al., 1999) entre 20,0 a 25,8.

4.1.1.3 Seleção dos voluntários

A seleção dos voluntários foi realizada após aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Processo HCRP 10840/00, Reunião Ordinária nº 103 de 19/02/2001 (ANEXO B).

O número de voluntários, para o presente trabalho, foi baseado em estudos anteriores relacionados com a absorção de ferro, quando foram utilizados entre 6 a 10 indivíduos adultos por tratamento (Cook et al., 1973; Hallberg et al., 1986; Björn-Rasmussen et al., 1977; Roe & Fairweather-Tait, 1999).

4.1.1.4 Recrutamento dos voluntários

Os voluntários foram selecionados entre os servidores do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), participantes do Programa de Ginástica Laboral.

Inicialmente foi divulgado o estudo durante as aulas do programa e distribuído o questionário (ANEXO C) apenas aos interessados que estavam de acordo com os critérios de inclusão e de exclusão.

Após o preenchimento dos questionários foram analisados os prontuários médicos para verificar a concordância das informações prestadas com os exames periódicos, obrigatório a todos os servidores pelo Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO) do Ministério do Trabalho ou de consultas médicas decorrentes de alguma queixa. Foram considerados os servidores cujos exames clínicos e os laboratoriais de glicemia, parasitológico e hematológico, não ultrapassaram 06 meses.

Entre os 19 interessados foram excluídos 05 por se encontrarem com o índice de massa corpórea (IMC) maior que o estabelecido, 03 por problemas de escala de serviços e 01 por preferir permanecer como opção.

A participação dos voluntários selecionados no estudo, foi estabelecida mediante preenchimento do “Termo de Consentimento Pós Informação” (ANEXO D) e somente confirmada, no 1º tratamento após a realização do hemograma, da glicemia durante as coletas e das determinações da ferritina sérica, da capacidade de

ligação de ferro sérico (UIBC), capacidade de ligação total de ferro sérico (TIBC) e porcentagem de saturação da transferrina.

4.1.2 Delineamento experimental

Após selecionado, os voluntários foram submetidos durante 28 dias a 5 tratamentos descritos abaixo com intervalos de 7 dias, conforme Figura 3.

- **1º tratamento**

- 1 – Alimentar-se com dieta pobre em cálcio e fibras no dia anterior. Não comer alimento de origem animal, por exemplo, carne e fígado, 72 horas antes;
- 2 – Permanecer em jejum por um período mínimo de 8 (oito) horas (durante o período noturno) das 23:00 horas às 7:00 horas;
- 3 – Coletar 8,0 (oito) mililitros (mL) de sangue, após o jejum;
- 4 – Tomar 3 cápsulas vazias com o auxílio de 250 mL de água deionizada;
- 5 – Permanecer em jejum por mais 12 (doze) horas, sendo durante este período coletadas amostras de sangue correspondente a aproximadamente 3,0 (três) mL em cada coleta, nos tempos 30 (trinta) minutos (?), 1 (uma) hora, 2 (duas) horas, 4 (quatro) horas, 8 (oito) horas e 12 (doze) horas após a primeira coleta, totalizando aproximadamente 21 (vinte e um) mL de sangue;

6 – Permanecer em jejum durante todo o período, podendo beber água deionizada;

7 – Este tratamento foi identificado como C.

- **2º tratamento**

1 – Alimentar-se com dieta pobre em cálcio e fibras no dia anterior, não comer alimento de origem animal, por exemplo, carne e fígado, 72 horas antes;

2 – Permanecer em jejum por um período mínimo de 8 (oito) horas (durante o período noturno) exemplo: das 23:00 horas às 7:00 horas;

3 – Coletar 3,0 (três) mililitros (mL) de sangue, após o jejum;

4 – Tomar cápsulas contendo 60 mg de ferro, na forma de sulfato ferroso ou complexo ferro-peptídeo, com o auxílio de 250 mL de água deionizada;

5 – Permanecer em jejum por mais 12 (doze) horas, sendo neste período coletadas amostras de sangue correspondente a aproximadamente 3,0 (três) mL em cada coleta, nos tempos 30' (trinta), 1 (uma) hora, 2 (duas) horas, 4 (quatro) horas, 8 (oito) horas e 12 (doze) horas, após a ingestão do sulfato ferroso ou complexo ferro-peptídeo, totalizando aproximadamente 21 (vinte e um) mL de sangue.

6 – Este tratamento foi identificado como SF quando os voluntários receberam o sulfato ferroso e como FP1 quando receberam o complexo ferro-peptídeo.

- **3º tratamento**

1 – Repetir o 2º tratamento, substituindo o composto. Tomar o complexo ferro-peptídeo (voluntários ímpares) ou sulfato ferroso (voluntários pares).

2 – Este tratamento foi identificado como SF quando os voluntários receberam o sulfato ferroso e como FP1 quando receberam o complexo ferro-peptídeo.

- **4º tratamento**

1 – Alimentar-se com dieta pobre em cálcio e fibras no dia anterior, não comer alimento de origem animal, por exemplo, carne e fígado, 72 horas antes;

2 – Permanecer em jejum por um período mínimo de 8 (oito) horas (durante o período noturno) exemplo: das 23:00 horas às 7:00 horas;

3 – Coletar 3,0 (três) mililitros (mL) de sangue após jejum;

4 – Tomar cápsulas contendo 80 mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com o auxílio de 250 mL de água deionizada;

5 – Permanecer em jejum por mais 12 (doze) horas, sendo neste período coletadas amostras de sangue correspondente a aproximadamente 3,0 (três) mL em cada coleta, nos tempos 30' (trinta), 1 (uma) hora, 2 (duas) horas, 4 (quatro) horas, 8 (oito) horas e 12 (doze) horas, após a ingestão do complexo ferro-peptídeo, totalizando aproximadamente 21 (vinte e um) mL de sangue.

6 – Este tratamento foi identificado como FP2.

- **5º tratamento**

1 – Alimentar-se com dieta pobre em cálcio e fibras no dia anterior, não comer alimento de origem animal, por exemplo, carne e fígado, 72 horas antes;

2 – Tomar o café da manhã, sem leite, café ou chá; comer somente 2 pães de 50g cada;

3 – Tomar cápsulas contendo 60 mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com o auxílio de 250 mL de água deionizada;

4 – Coletar aproximadamente 3,0 (três) mL de sangue após jejum;

5 – Coletar amostras de sangue correspondente a aproximadamente 3,0 (três) mL em cada coleta, nos tempos 30' (trinta), 1 (uma) hora, 2 (duas) horas, 4 (quatro) horas após a ingestão de complexo ferro-peptídeo;

6 – Almoçar após 4 horas do início das coletas com dieta pobre em cálcio e fibras;

7 – Coletar amostras de sangue correspondente a aproximadamente 3,0 (três) mL em cada coleta, nos tempos 8 (oito) horas e 12 (doze) horas após a ingestão do complexo ferro-peptídeo, totalizando aproximadamente 21 (vinte e um) mL de sangue.

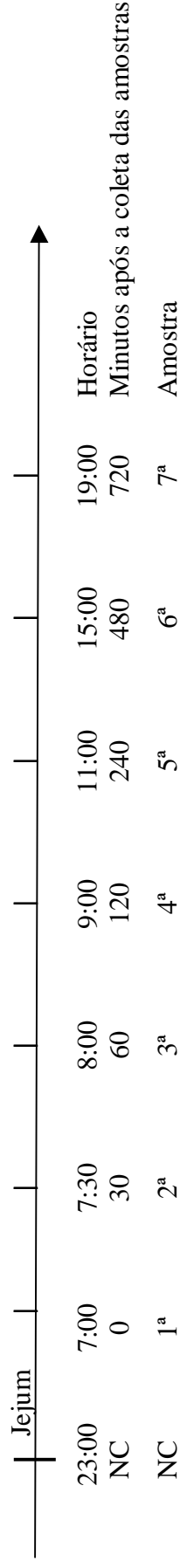
8 – Este tratamento foi identificado como FPD.

A Figura 3 demonstra esquematicamente o delineamento experimental referente a cada tratamento.

4.1.3 Verificação de efeitos indesejáveis durante os 5 tratamentos

Após cada coleta verificar a ocorrência de possíveis efeitos colaterais como tontura, náusea, queimação no estômago, dor abdominal e diarreia, nos voluntários.

Figura 3 – Delineamento experimental, referente a cada tratamento, cumprido pelos voluntários de números 01 a 10, submetidos aos tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD



NC: Não Coletado

1º tratamento – receberam apenas 3 cápsulas vazias e água deionizada (tratamento C)

2º tratamento – receberam às 7:00 horas 60 mg de ferro, na forma de sulfato ferroso (tratamento SF) ou complexo ferro-peptídeo (tratamento FP1)

3º tratamento – receberam às 7:00 horas 60 mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo (tratamento FP1) ou sulfato ferroso (tratamento SF)

4º tratamento – receberam às 7:00 horas 80 mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo (tratamento FP2)

5º tratamento – receberam às 7:00 horas 60 mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo com dieta (tratamento FPD)

4.2 MATERIAL

Para realização do presente estudo foram utilizados:

- Agitador mecânico marca Ética®
- Aparelho de absorção atômica marca Perkin Elmer® A Analyst 700
- Aparelho para determinação do tempo de desintegração para comprimidos e cápsulas marca: Ética®
- Balança analítica eletrônica: Marte®
- Cápsulas gelatinosas nº 0
- Centrífuga para determinação do hematócrito: Fanen®
- Centrífuga refrigerada: Dupont®
- Cloreto férrico hexahidratado: Merck®
- Cobas Integra 700 para determinação bioquímica: Roche®
- Complexo ferro-peptídeo
- Conjunto reagente para a determinação da capacidade de ligação do ferro (UIBC), para aparelho Cobas Integra 700: Roche®
- Conjunto reagente para a determinação de ferritina sérica para aparelho Immulite/DPC®
- Conjunto reagente para a determinação de glicemia para aparelho Cobas Integra 700: Roche®
- Conjunto reagente para a determinação do ferro sérico, para aparelho Cobas Integra 700: Roche®
- Coulter® mod. STKS para a realização de hemograma

- Hidrolisado de caseína: Biobrás®
- Immulite Analyser marca DPC® (Diagnostic products Corporation)
- Liofilizador marca Labronco®
- pHmetro: Micronal®
- Sulfato ferroso dessecado
- Tubos para coleta de sangue a vácuo em vidro transparente, incolor, siliconizado, estéril, com gel separador inerte, para soro e ativador de coágulo, marca Becton Dickinson®, ref. 367783

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Preparo do complexo ferro-peptídeo

O complexo ferro-peptídeo foi preparado de acordo com Chaud (1993), utilizando-se o procedimento abaixo.

Procedimento:

- A 1 litro de solução a 10% p/v de hidrolisado de caseína (marca Biobrás® S/A, lote BCC – 227) ajustado a pH 7,8, com hidróxido de sódio, foram adicionados sob agitação por 3 horas, 100 mL de solução a 25% p/v de cloreto férrico hexahidratado (marca Merck®, ref: 1.03943-02500) em seguida liofilizado.

A elevação do pH a 7,8 da dispersão do hidrolisado de caseína tem como objetivo desprotonar os grupamentos carboxila (COOH) e Amino (NH₃) e permitir a coordenação do ferro aos peptídeos e aminoácidos (Chaud, 1993). O ion H⁺ liberado reduz o pH a próximo de 3,5 e precipita o complexo ferro-peptídeo formado. Posteriormente a secagem é realizada por liofilização para evitar uma possível decomposição da substância pelo calor.

4.3.2 Verificação da presença de ferro (Fe^{+3}), na solução de cloreto férrico após filtração, na dispersão do complexo ferro-peptídeo em água e no filtrado

Procedimento:

- Filtrar separadamente a solução de cloreto férrico e a dispersão de 1 g de complexo ferro-peptídeo em 5 mL de água deionizada;
- Adicionar aos filtrados 0,5 mL de solução reagente a 1% p/v de ferricianeto de potássio e à dispersão do complexo ferro-peptídeo em água;
- A formação da cor azul indica a presença de ferro no meio.

4.3.3 Determinação do teor de ferro no complexo ferro-peptídeo preparado

Procedimento:

- Dispersar 50 mg de complexo ferro-peptídeo em 80 mL de água deionizada;
- Alcalinizar com hidróxido de sódio a pH 8,0;
- Completar com água deionizada para 100 mL;
- Centrifugar a 13.000 rpm/10';
- Diluir o sobrenadante a 1/25;

- Determinar o teor de ferro, utilizando-se o aparelho de absorção atômica marca Perkin Elmer® A Analyst 700, em comprimento de onda 248,3 nm e lâmpada específica.

4.3.4 Preparo de cápsulas contendo 60 mg de ferro, utilizando-se o complexo ferro-peptídeo (5,09% p/p Fe) e sulfato ferroso dessecado (32,2% p/p Fe)

Procedimento:

- Foram pesados 1.178,8 mg de complexo ferro-peptídeo (5,09% p/p Fe) e distribuídos em 3 cápsulas gelatinosas duras, com capacidade de 0,68 mL e peso de $89,6 \pm 5,2$ mg;
- Foram pesados 186,3 mg de sulfato ferroso dessecado (32,2% p/p Fe) e colocado em 1 cápsula gelatinosa com capacidade de 0,68 mL e peso médio de $89,6 \pm 5,2$ mg.

4.3.5 Preparo de cápsulas contendo 80 mg de ferro, utilizando-se o complexo ferro-peptídeo (5,09% p/p Fe)

Procedimento:

- Foram pesados 1.571,7 mg de complexo ferro-peptídeo (5,09% p/p Fe) e distribuídos em 4 cápsulas gelatinosas duras, com capacidade de 0,68 mL e peso médio de $89,6 \pm 5,2$ mg;

4.3.6 Determinação do tempo de desintegração de cápsulas gelatinosas duras, contendo sulfato ferroso e complexo ferro-peptídeo

Procedimento:

- Colocar uma cápsula gelatinosa contendo o complexo ferro-peptídeo ou sulfato ferroso no interior de cada tubo, contido em um recipiente com o líquido recomendado, mantido em banho-maria do aparelho para determinação do tempo de desintegração de comprimidos e cápsulas em temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Verificar o tempo necessário para que todas as cápsulas estejam completamente desintegradas (Farmacopéia Brasileira, 1988).

4.3.7 Coleta de amostras

Procedimento:

- As amostras de sangue foram coletadas na Unidade Metabólica do HCFMRP-USP utilizando-se seringas e agulhas descartáveis com auxílio de escalpe e transferidas para os tubos a vácuo com gel separador inerte, para soro e ativador de coágulo, após retiradas as tampas para evitar a ocorrência de hemólise.

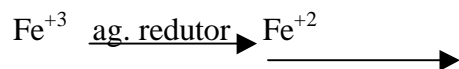
4.3.8 Determinação da ferremia

A metodologia utilizada no presente trabalho não determina o ferro da hemoglobina livre, portanto a hemólise apresenta pouquíssimo efeito na dosagem do ferro, entretanto amostras com hemólises intensas podem liberar pequenas quantidades de ferro da hemoglobina. Metodologias que utilizam a espectroscopia de absorção atômica determinam o ferro ligado a apotransferrina e da hemoglobina, portanto não devem ser utilizadas em amostras de soro com hemólise.

Procedimento:

- As determinações dos teores de ferro no soro foram realizadas no aparelho Cobas Integra 700 (Roche®), por método espectrofotométrico utilizando-se o reagente Ferrozine® (Stookey, 1970).
- O método fundamenta-se na formação do complexo Fe (II) – (Ferrozine) de cor vermelha após a liberação do Fe^{+3} da transferrina pela guanidina cloridrato e reduzido a Fe^{+2} pelo ascorbato e hidroxilamina.

Transferrina – Fe^{+3} guanidina HCl apotransferrina + Fe^{+3}



4.3.9 Determinação da ferritina sérica

Procedimento:

- As determinações dos teores de ferritina no soro foram realizadas no aparelho Immulite Analyser, DPC (Diagnótic Products Corporation®) por método imunométrico: imunoensaio enzimático quimioluminescente.

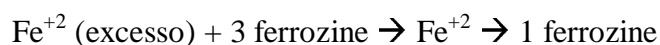
Fundamento:

O método fundamenta-se na medida da luz quimioluminescente emitida pelo substrato de dioxetano sob a ação da fosfatase alcalina, após incubação da amostra com fase sólida (pérola) recoberta com anticorpos antiferritina e o reagente marcado com a fosfatase alcalina seguida da lavagem e adição do dioxetano.

4.3.10 Determinação da capacidade de ligação do ferro (UIBC)

Procedimento:

- As determinações da capacidade de ligação do ferro foram realizadas no aparelho Cobas Integra 700/Roche® .
- O método fundamenta-se na formação do complexo Fe (II) – (Ferrozine) de cor vermelha pelo excesso de Fe, após incubação da amostra com quantidade conhecida de ferro.



4.3.11 Determinação da capacidade total de ligação do ferro (TIBC)

Procedimento:

- A determinação da capacidade total de ligação do ferro é realizada por meio da soma dos valores do ferro sérico (ferro ligado à transferrina) e da capacidade de ligação do ferro (UIBC).

4.3.12 Determinação da porcentagem (%) de saturação da transferrina

Procedimento:

- A determinação da porcentagem de saturação da transferrina foi realizada por meio de cálculo matemático que relaciona o teor de ferro sérico e a capacidade de ligação do ferro (TIBC).

$$\% \text{ de saturação da transferrina} = \frac{\text{teor de ferro sérico } (\mu\text{g/dL}) \times 100}{\text{TIBC } (\mu\text{g/dL})}$$

4.3.13 Cálculo das médias e desvios padrão das ferremias

As médias e os desvios padrão das ferremias de cada tratamento foram determinados a partir dos valores individuais nos tempos 0', 30', 60', 120', 240', 480' e 720'. As médias e os desvios padrão dos aumentos das ferremias,

determinados para fins de comparação, foram calculados a partir das diferenças entre as ferremias de cada tempo e a ferremia do tempo 0, dos tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD.

4.3.14 Determinação dos aumentos das ferremias

Os aumentos das ferremias foram calculados nos tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD subtraindo-se a ferremia determinada no tempo zero, das ferremias determinadas nos tempos 30', 60', 120', 240', 480' e 720' após o início das coletas.

4.3.15 Determinação das áreas sob as curvas dos tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD

As áreas sob as curvas foram determinadas utilizando-se os aumentos das ferremias dos tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD, de acordo com Matthew et al. (1990), utilizando-se a fórmula:

$$A = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{n-1} (T_{i+1} - T_i) (Y_i + Y_{i+1})$$

Onde A = área sob a curva ($\mu\text{g/dL}/\text{tempo em minutos}$)

T = tempo em minutos

Y = aumento da ferremia em $\mu\text{g/dL}$ (determinada pela diferença entre as ferremias de cada tempo e a ferremia do tempo 0)

4.3.16 Análise Estatística

A análise estatística realizada foi a análise de variância não paramétrica, por meio do teste de Friedman, para se comparar os tratamentos: C, SF, FP1, FP2 e FPD utilizando-se os aumentos das ferremias determinados nos diferentes tempos, com nível de significância de 0,05 e o teste de Dunn para identificar as diferenças (Hollander & Wolfe, 1973; Siegel, 1975). Foram, também, comparadas as áreas sob as curvas nos intervalos de tempo de 0'-240', 240'-720' e 0'-720', calculadas a partir dos aumentos das ferremias. As análises foram realizadas utilizando-se o Software Prism Version 3.0, Windows 95 and NT (1999).

5 RESULTADOS

Os voluntários selecionados apresentaram altura, peso, IMC e idade conforme Tabela 4, índices hematológicos considerados normais conforme Hoffbrand et al. (2001) apresentados na Tabela 5. Os resultados obtidos foram utilizados para confirmar as condições necessárias para participar do estudo, após seleção prévia realizada mediante preenchimento do questionário e análise do prontuário médico.

Tabela 4 – Dados referentes aos voluntários participantes do estudo

Voluntário	Altura (m)	Peso (kg)	IMC (kg/m ²)	Idade (anos)
01	1,60	66	25,80	43
02	1,79	74	23,10	31
03	1,76	70	22,50	30
04	1,70	67	23,20	26
05	1,68	72	25,50	36
06	1,78	79	24,90	22
07	1,78	79	24,90	37
08	1,84	68	20,00	21
09	1,75	73	23,90	34
10	1,62	65	24,80	38
MD	1,73	71,3	23,86	31,8
DP	0,07	5,03	1,74	7,17

IMC = Índice de massa corpórea

MD = Média

DP = desvio padrão

Tabela 5 – Índices hematológicos de voluntários participantes do estudo

Voluntário	Hb g/dL	Ht %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hemácias 10 ⁶ /μL
01	14,0	39	86	32	37	4,55
02	17,0	50	83	28	34	6,06
03	15,2	43	79	28	35	5,53
04	15,0	44	86	29	34	5,13
05	15,7	45	86	30	35	5,15
06	15,2	43	81	28	35	5,40
07	15,7	44	91	32	36	4,86
08	14,8	42	83	29	36	5,03
09	14,9	41	84	31	36	4,88
10	15,9	50	88	28	32	5,65
MD	15,3	44	85	30	35	5,22
DP	0,80	3,54	3,47	1,65	1,41	0,44

Hb = Hemoglobina

Ht = Hematócrito

MCV = Volume corpuscular médio

MCH = Hemoglobina corpuscular média

MCHC = Concentração média de hemoglobina corpuscular

MD = Média

DP = Desvio Padrão

5.1 Presença de ferro na solução de cloreto férrico após filtração, na dispersão aquosa do complexo ferro-peptídeo e no filtrado

Dispersão aquosa do complexo ferro-peptídeo em presença de solução reagente de ferricianeto de potássio: cor azul.

Filtrado da solução de cloreto férrico em presença de solução reagente de ferricianeto de potássio: cor azul.

Filtrado da dispersão aquosa do complexo ferro-peptídeo em presença de solução reagente de ferricianeto de potássio: não houve a formação de cor azul, indicando, portanto, a ausência de ferro livre e que todo o ferro utilizado na preparação do complexo, permaneceu ligado.

5.2 Teor de ferro no complexo ferro-peptídeo preparado

O teor de ferro determinado no complexo ferro-peptídeo foi de 5,09% p/p, valor utilizado para se determinar a quantidade da substância necessária para se fornecer 60 mg e 80 mg de ferro.

As substâncias sulfato ferroso e complexo ferro-peptídeo, utilizadas no estudo foram administradas na forma de cápsulas gelatinosas duras. Foram determinados previamente os tempos de desintegração (Tabela 6) utilizando-se metodologia preconizada pela Farmacopéia Brasileira (1988).

Tabela 6 – Teste de desintegração em cápsulas gelatinosas duras, contendo complexo ferro-peptídeo e sulfato ferroso, em meio aquoso e em pH 4,0 ajustado com ácido clorídrico (HCl)

Cápsulas	Meio	Tempo de desintegração em minutos
Complexo ferro-peptídeo	Água	10
Sulfato ferroso	Água	10
Complexo ferro-peptídeo	HCl pH = 4,0	11
Sulfato ferroso	HCl pH = 4,0	11

Os teores de ferritina sérica (Tabela 7), UIBC (Tabela 8), TIBC (Tabela 9) e porcentagem de saturação da transferrina (Tabela 10) foram determinados no tempo zero, dos dias 0, 7, 14 e 28 do estudo, no sentido de se identificar possíveis alterações nos níveis de reserva do ferro.

Os ANEXOS E, F, G, H e I mostram as ferremias verificadas dos tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD respectivamente referentes aos voluntários selecionados identificados de 01 a 10, que participam do estudo obtidas à partir das amostras coletadas nos tempos 0', 30', 60', 120', 240' e 720'. A média e os respectivos desvios padrão (Tabela 11) foram calculados à partir das ferremias determinadas em cada tempo de cada tratamento. Posteriormente foram calculadas as diferenças entre as ferremias das amostras coletadas nos tempos 30', 60', 120', 240' e 720' e ferremia determinada no tempo zero (Tabela 12) e representadas graficamente na Figura 4, esses valores foram utilizados para o cálculo das áreas acumuladas sob a curva em $\mu\text{g/dL}$ entre os tempos 0' – 240', 240' – 720' e 0' – 720' (Tabela 13) representados graficamente nas Figuras 5, 6 e 7.

Tabela 7 – Teores de ferritina sérica, em ng/mL, dos voluntários participantes dos tratamentos experimentais, determinados nos tempos zero dos dias 0, 7, 14 e 28

Voluntários	Tempo em dias				MD	DP	CV
	0	7	14	28			
01	143	128	131	123	131,3	8,5	6,5
02	227	214	208	185	208,5	17,6	8,4
03	182	180	192	194	187,0	7,0	3,8
04	115	109	112	103	109,8	5,1	4,7
05	44	52	54	55	51,3	5,0	9,7
06	306	348	329	297	320,0	23,0	7,2
07	108	108	97	99	103,0	5,8	5,7
08	121	99	98	95	103,3	12,0	11,6
09	134	137	142	137	137,5	3,3	2,4
10	162	148	137	122	142,3	16,9	11,9
MD	154,2	152,3	150	141	149,4	10,4	7,0
DP	72,0	82,0	77,4	68,7	74,6	6,7	8,9

MD = Média

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variação em porcentagem

Tabela 8 – Capacidade de ligação de ferro sérico (UIBC), em $\mu\text{g/dL}$, dos voluntários participantes dos tratamentos experimentais, determinados no tempo zero dos dias 0, 7, 14 e 28

Voluntários	Tempo em dias				MD	DP	CV
	0	7	14	28			
01	178	220	209	181	196,8	20,8	10,6
02	224	292	209	261	246,8	37,3	15,1
03	143	182	174	152	162,9	18,1	11,1
04	238	214	257	257	241,4	20,4	8,4
05	250	257	199	239	236,2	25,9	11,0
06	307	310	307	332	314,0	11,8	3,8
07	213	245	238	248	236,2	15,9	6,7
08	222	228	230	253	233,2	13,3	5,7
09	162	162	167	170	165,1	3,9	2,4
10	204	191	204	227	206,5	14,8	7,2
MD	214,1	230,1	219,5	231,9	223,9	18,2	8,1
DP	46,9	47,2	41,2	52,7	44,2	9,0	20,3

MD = Média

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variação em porcentagem

Tabela 9 – Capacidade total de ligação de ferro sérico (TIBC), em $\mu\text{g/dL}$, dos voluntários participantes dos tratamentos experimentais, determinados no tempo zero dos dias 0, 7, 14 e 28

Voluntários	Tempo em dias				MD	DP	CV
	0	7	14	28			
01	293	333	321	280	306,8	24,4	7,9
02	306	388	296	356	336,5	43,5	12,9
03	231	263	256	250	249,9	13,9	5,6
04	338	335	394	347	353,5	27,5	7,8
05	314	323	263	304	301,0	26,3	8,7
06	407	416	412	444	420,0	16,5	3,9
07	330	355	348	366	349,4	15,1	4,3
08	300	304	309	326	309,8	11,4	3,7
09	289	297	285	304	293,7	8,2	2,8
10	302	283	298	303	296,4	9,2	3,1
MD	310,9	329,8	318,1	327,9	321,7	19,6	6,1
DP	44,5	47,1	52,1	54,0	46,0	10,9	23,7

MD = Média

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variação em porcentagem

Tabela 10 – Saturação da transferrina sérica, em porcentagem, dos voluntários participantes dos tratamentos experimentais, determinados no tempo zero dos dias 0, 7, 14 e 28

Voluntários	Tempo em dias				MD	DP	CV
	0	7	14	28			
01	39	34	35	35	35,9	2,4	6,7
02	27	29	28	27	27,5	1,2	4,4
03	38	31	32	39	35,0	4,1	11,8
04	30	36	35	26	31,6	4,6	14,6
05	20	20	24	21	21,7	1,9	8,8
06	25	26	25	25	25,2	0,4	1,6
07	35	31	32	32	32,4	1,9	5,9
08	26	25	26	23	24,8	1,5	6,2
09	44	46	41	44	43,8	1,8	4,0
10	33	33	31	25	30,4	3,5	11,5
MD	31,6	31,0	30,9	29,8	30,8	2,3	7,6
DP	7,4	6,9	5,3	7,6	6,5	1,3	20,6

MD = Média

DP = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variação em porcentagem

Tabela 11 – Médias \pm desvios padrão das ferremias, em $\mu\text{g/dL}$, após os tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD

TJ	TC	C	SF	FP1	FP2	FPD
480	0	97 \pm 19	100 \pm 22	99 \pm 21	96 \pm 21	92 \pm 14
510	30	93 \pm 20	96 \pm 21	95 \pm 21	93 \pm 22	91 \pm 16
540	60	94 \pm 18	113 \pm 24	97 \pm 21	97 \pm 24	94 \pm 16
600	120	99 \pm 20	133 \pm 27	101 \pm 21	102 \pm 26	100 \pm 18
720	240	110 \pm 23	151 \pm 27	114 \pm 29	123 \pm 26	107 \pm 23
960	480	136 \pm 36	160 \pm 31	132 \pm 47	145 \pm 26	123 \pm 34
1200	720	140 \pm 45	150 \pm 41	142 \pm 59	146 \pm 46	112 \pm 34

TJ = Tempo em minutos de permanência em jejum.

TC = Tempo em minutos após o início do estudo.

C = Controle, sem receber nenhuma fonte de ferro.

SF = Após receberem 60mg de ferro, na forma de sulfato ferroso.

FP1 = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FP2 = Após receberem 80mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FPD = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com dieta isenta de inibidores da absorção de ferro.

Tabela 12 – Médias \pm desvios padrão, em $\mu\text{g/dL}$, dos aumentos das ferremias, após os tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD

TJ	TC	C	SF*	FP1	FP2	FPD
480	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
510	30	-4 ± 3	-4 ± 3	-3 ± 3	-3 ± 5	-1 ± 6
540	60	-3 ± 4	14 ± 11	0 ± 6	0 ± 6	2 ± 8
600	120	2 ± 8	33 ± 14	3 ± 14	6 ± 11	8 ± 13
720	240	13 ± 21	51 ± 16	16 ± 31	27 ± 21	15 ± 21
960	480	39 ± 41	60 ± 33	34 ± 58	49 ± 31	31 ± 34
1200	720	43 ± 51	51 ± 46	44 ± 70	50 ± 55	20 ± 34

TJ = Tempo em minutos de permanência em jejum.

TC = Tempo em minutos após o início do estudo.

C = Controle, sem receber nenhuma fonte de ferro.

SF = Após receberem 60mg de ferro, na forma de sulfato ferroso.

FP1 = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

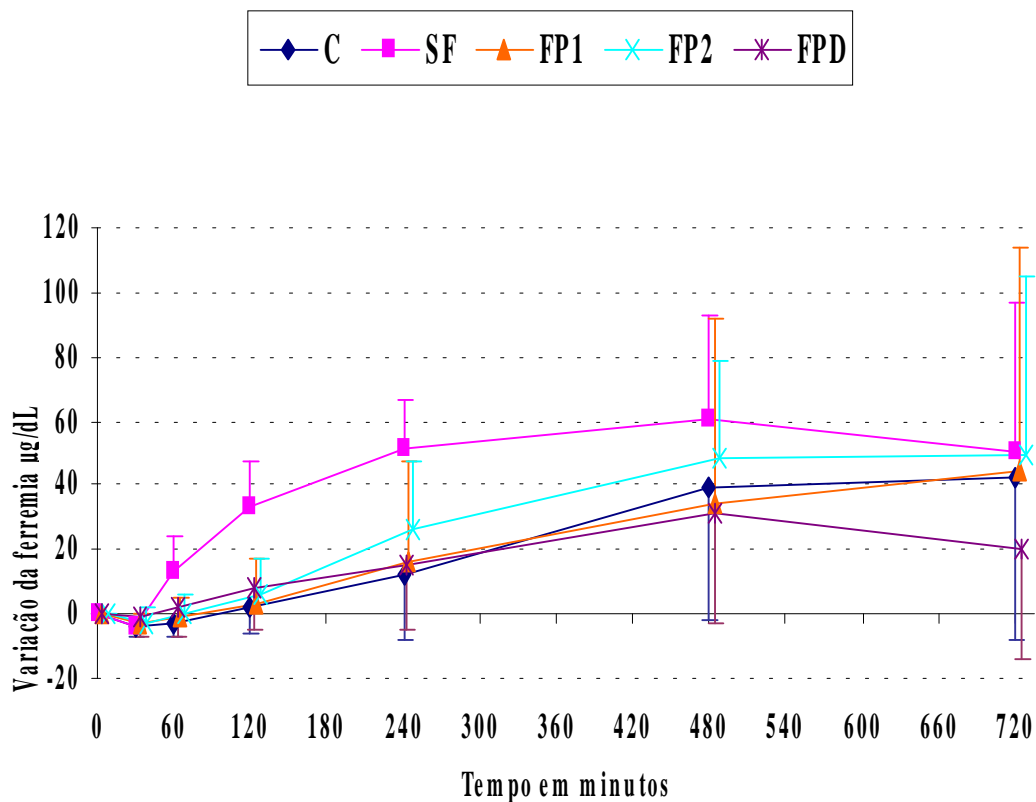
FP2 = Após receberem 80mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FPD = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com dieta isenta de inibidores da absorção de ferro.

* $p < 0,01 = \text{SFxC (60', 120', 240')}; \text{SFxFP1 (120')}; \text{SFxFPD (240')}$

$p < 0,05 = \text{SFxFP1 (240', 480')}; \text{SFxFPD (480')}$

Figura 4 – Médias \pm desvios padrão dos aumentos das ferremias, em $\mu\text{g/dL}$, após os tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD



C = Controle, sem receber nenhuma fonte de ferro.

SF = Após receberem 60mg de ferro, na forma de sulfato ferroso.

FP1 = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FP2 = Após receberem 80mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FPD = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com dieta isenta de inibidores da absorção de ferro.

* $p < 0,01$ = SFxC (60', 120', 240'); SFxFP1 (120'); SFxFPD (240')

$p < 0,05$ = SFxFP1 (240', 480'); SFxFPD (480')

Tabela 13 – Médias \pm desvios padrão, em $\mu\text{g/dL}$, das áreas acumuladas sob as curvas após os tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD, entre os intervalos de tempos de 0' – 240', 240' – 720', 0' – 720', determinados a partir dos aumentos das ferremias, nos diferentes tempos do estudo, em relação ao tempo 0

Intervalo de tempo em minutos	C	SF	FP1	FP2	FPD
0 – 240*	711 \pm 1989	6579 \pm 2433	1159 \pm 3423	2130 \pm 2336	1683 \pm 2850
240 – 720**	16049 \pm 18067	26720 \pm 13877	15470 \pm 25623	20839 \pm 15500	11674 \pm 14351
0 – 720***	16760 \pm 19878	33299 \pm 14511	16629 \pm 28882	22969 \pm 17010	13357 \pm 17005

C = Controle, sem receber nenhuma fonte de ferro.

SF = Após receberem 60mg de ferro, na forma de sulfato ferroso.

FP1 = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FP2 = Após receberem 80mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

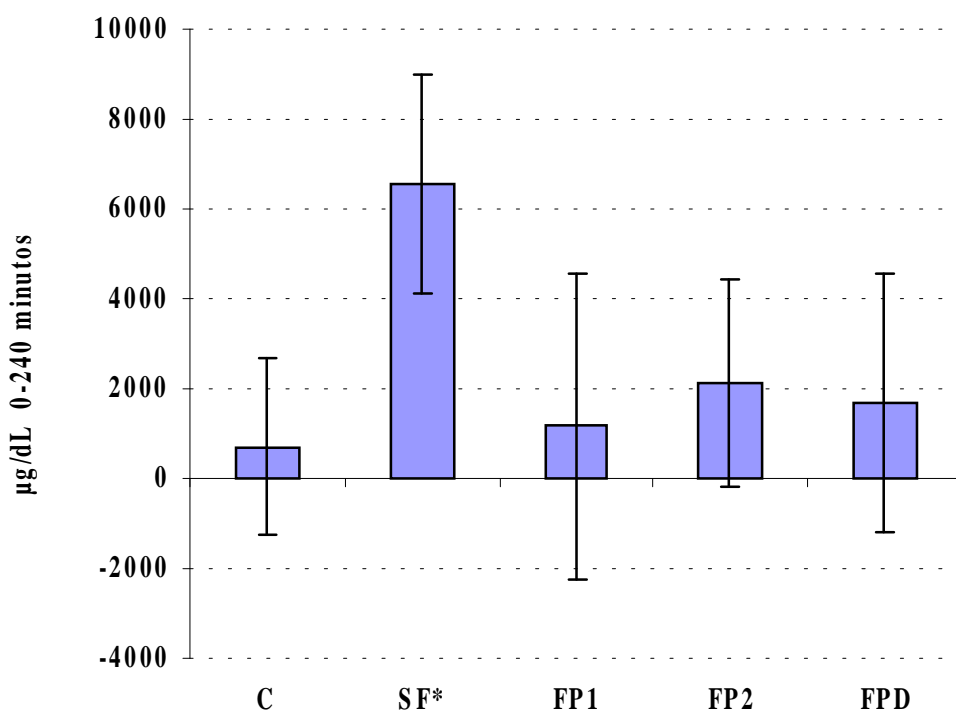
FPD = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com dieta isenta de inibidores da absorção de ferro.

* $p < 0,01 = \text{SFxC}$, $p < 0,05 = \text{SFxFP1}$

** $p < 0,05 = \text{SFxFP1}$, SFxFPD

*** $p < 0,05 = \text{SFxC}$, SFxFP1 , SFxFPD

Figura 5 – Médias \pm desvios padrão, em $\mu\text{g/dL}$, das áreas acumuladas sob as curvas após os tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD, entre o intervalo de tempo de 0'-240', determinados a partir dos aumentos das ferremias, nos diferentes tempos do estudo, em relação ao tempo 0



C = Controle, sem receber nenhuma fonte de ferro.

SF = Após receberem 60mg de ferro, na forma de sulfato ferroso.

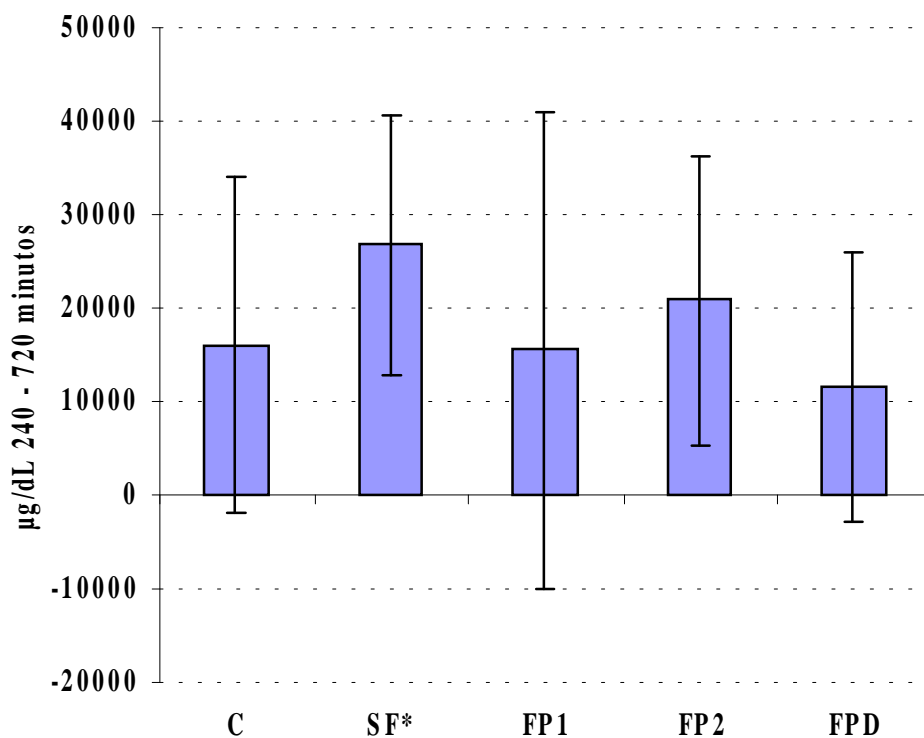
FP1 = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FP2 = Após receberem 80mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FPD = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com dieta isenta de inibidores da absorção de ferro.

* $p < 0,01 = (\text{SF} \times \text{C})$, $p < 0,05 = (\text{SF} \times \text{FP1})$

Figura 6 – Médias \pm desvios padrão, em $\mu\text{g/dL}$, das áreas acumuladas sob as curvas após os tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD, entre o intervalo de tempo de 240'–720', determinados a partir dos aumentos das ferremias, nos diferentes tempos do estudo, em relação ao tempo 0



C = Controle, sem receber nenhuma fonte de ferro.

SF = Após receberem 60mg de ferro, na forma de sulfato ferroso.

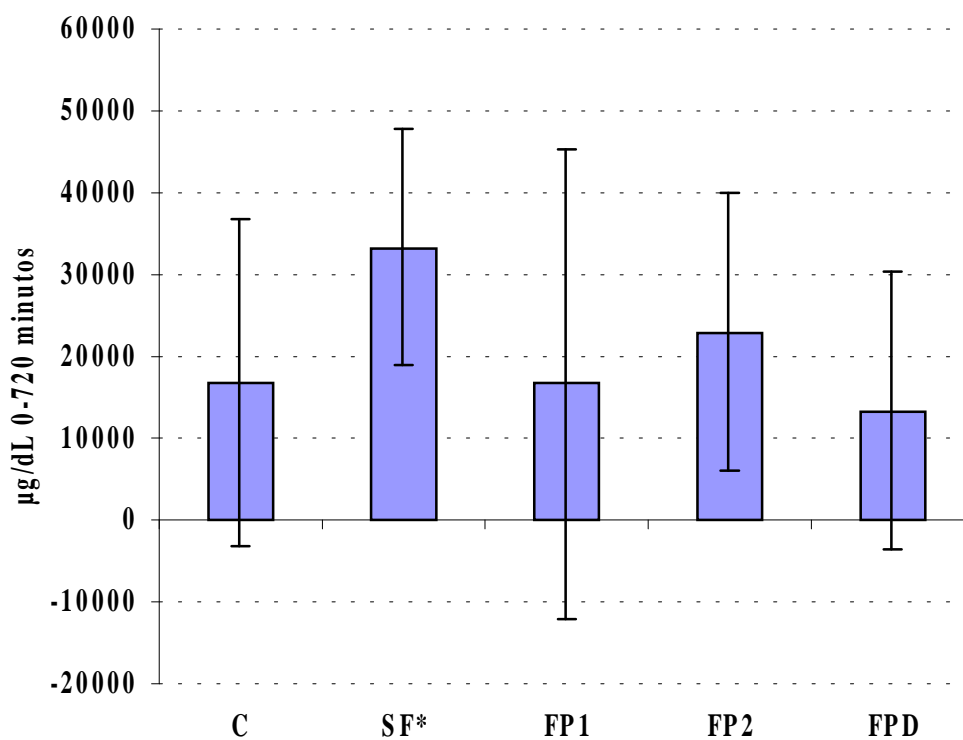
FP1 = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FP2 = Após receberem 80mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FPD = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com dieta isenta de inibidores da absorção de ferro.

* $p < 0,05 = (\text{SFxFP1}, \text{SFxFPD})$

Figura 7 – Médias \pm desvios padrão, em $\mu\text{g/dL}$, das áreas acumuladas sob as curvas após os tratamentos C, SF, FP1, FP2 e FPD, entre o intervalo de tempo de 0'–720', determinados a partir dos aumentos das ferremias, nos diferentes tempos do estudo, em relação ao tempo 0



C = Controle, sem receber nenhuma fonte de ferro.

SF = Após receberem 60mg de ferro, na forma de sulfato ferroso.

FP1 = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FP2 = Após receberem 80mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo.

FPD = Após receberem 60mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com dieta isenta de inibidores da absorção de ferro.

* $p < 0,05 = (\text{SFx}C, \text{SFx}FP1, \text{SFx}FPD)$

6 DISCUSSÃO

O estudo foi realizado em homens saudáveis, aplicando-se os seguintes tratamentos: controle (C) quando não receberam nenhuma fonte de ferro, e quando receberam 60 mg de ferro como sulfato ferroso (SF), 60 mg como complexo ferro-peptídeo (FP1) e 80 mg como complexo ferro-peptídeo (FP2), em jejum para possibilitar que os compostos utilizados como fonte de ferro pudessem ter um maior contato com os locais de absorção na luz intestinal. Para avaliar os efeitos da administração de dieta isenta de inibidores da absorção de ferro, foram fornecidos alimentos constituídos basicamente por carboidratos durante e após administração de 60 mg de ferro como complexo ferro-peptídeo (FPD).

O intervalo de 7 dias entre os tratamentos, foi estabelecido para evitar os efeitos das administrações anteriores de ferro. O'Neil-Cutting et al. (1987) verificaram a ocorrência de bloqueio temporário e parcial da absorção do ferro, em indivíduos com moderada deficiência de ferro 24 horas após a administração de sulfato ferroso por via oral, possivelmente devido a saturação das células da mucosa intestinal.

Os voluntários selecionados para participar do estudo, apresentavam, na ocasião, índice de massa corpórea correspondente a indivíduos eutróficos (Heymsfield et al., 1999), em idade adulta não faziam uso de medicações, não haviam sido afastados de suas atividades profissionais nos últimos 2 anos, estavam com os exames periódicos obrigatórios pela legislação trabalhista em dia, e não apresentavam vícios, especialmente alcoolismo ou tabagismo, ou doenças que pudessem provocar o aumento ou diminuição anormal da ferremia, portanto os resultados obtidos representam o comportamento da ferremia em indivíduos saudáveis.

A ausência de anemia ferropriva, considerada o estágio mais avançado da deficiência de ferro, foi confirmada pela determinação dos índices laboratoriais, conforme Hoffbrand et al. (2001).

A determinação da ferritina sérica, considerada a medida que representa os estoques de ferro no organismo, comprovou que os voluntários não apresentavam condições fisiológicas que provocam o aumento ou diminuição da absorção do ferro como a deficiência ou a sobrecarga. Durante o estudo não houve variação significativa ($p > 0,05$) nos níveis séricos da ferritina, mesmo nos voluntários que apresentaram valores mais próximos aos considerados limítrofes aos normais pelo método empregado, entre 28 e 397 ng/mL. Esses resultados demonstraram que as fontes de ferro administradas nos protocolos e a alimentação ingerida no período em estudo de 28 dias, não alteraram os estoques de ferro, mesmo após a administração do sulfato ferroso, quando se verificou um aumento na ferremia. Provavelmente o ferro absorvido, decorrente de uma única administração de sulfato ferroso, em quantidade equivalente a 60 mg de ferro, não foi suficiente para provocar um aumento significativo nos estoques de ferro.

A ferremia apresenta uma relação direta com a porcentagem de saturação da transferrina e inversa à capacidade de ligação do ferro (UIBC), isto é, o aumento da ferremia é acompanhado pelo aumento da porcentagem de saturação da transferrina e diminuição da (UIBC), no entanto a capacidade total de ligação do ferro (TIBC) não se altera (Stengle & Schade, 1957). Os coeficientes de variação (CV) determinados dos teores de UIBC, TIBC, ferremia e porcentagem de saturação da transferrina demonstram que, no período do estudo, os níveis das proteínas responsáveis pelo transporte do ferro mantiveram-se relativamente estáveis. Esses valores foram normais nos voluntários e não se alteraram durante o estudo.

O estudo das variações das ferremias após a administração de elementos ou substâncias endógenas, torna-se difícil principalmente quando ocorrem variações durante os períodos do dia. O ferro é um elemento químico que apresenta variações conhecidas como ciclo circadiano. No presente estudo, para possibilitar uma análise sem a interferência dessas variações, foram determinadas as diferenças que ocorrem nas ferremias controle e comparadas com as determinadas nos demais tratamentos, quando receberam ferro nas formas de sulfato ferroso e complexo ferro-peptídeo.

As substâncias sulfato ferroso e complexo ferro-peptídeo, preparadas em forma de cápsulas gelatinosas possibilitaram a administração precisa das quantidades estabelecidas pelos tratamentos e, sendo de fácil deglutição, garantiu a ingestão total das quantidades estabelecidas sem qualquer risco de perda total ou parcial das substâncias, durante as administrações. A pesagem individual, em balança analítica e posterior distribuição manual das substâncias, assegurou a exatidão das quantidades e a uniformidade das doses. O tempo de desintegração determinado de 11 minutos, garantiu que as substâncias foram liberadas integralmente no estômago.

A ausência de hipoglicemia e a eliminação da possibilidade da variação da glicemia (ANEXO J) decorrente da ingestão das cápsulas, foram constatadas em amostras coletadas no tratamento controle (C), sugerindo que elas não provocaram qualquer alteração fisiológica.

As variações nas ferremias, teores de ferro sérico maiores de manhã e menores no início da noite, observadas em um dos voluntários, estão de acordo com os estudos realizados em ratos por Lynch et al. (1973) e em seres humanos por (Hemmeler, 1944; Stengle & Schade, 1957; Uchida et al., 1983; Castro et al., 1995). Porém os demais voluntários apresentaram variações, no período estudado, contrárias e de acordo com os estudos de Wiltink et al. (1973). Essas variações ocorrem provavelmente em função da ação fagocitária dos macrófagos, que após a destruição das hemácias envelhecidas libera aproximadamente 20 mg de ferro/dia no plasma (Finch et al., 1970) e devido ao sistema adrenérgico. Castro et al. (1995) verificaram que a administração do bloqueador β adrenérgico propranolol, em voluntários sadios, provocou a diminuição das variações dos níveis de ferro sérico quando comparados com as variações determinadas sem a administração, sugerindo que o ritmo circadiano é parcialmente decorrente do sistema simpatoadrenal.

As determinações das ferremias controle possibilitam verificar se as variações que ocorrem nas ferremias são decorrentes das administrações das substâncias contendo ferro ou são fisiológicas. Os aumentos das ferremias decorrentes da administração de ferro, quando analisados isoladamente, sem relacionar com as ferremias controle, podem induzir os pesquisadores a conclusões incorretas. Portanto, as análises dos resultados obtidos foram realizadas comparando-se os aumentos das ferremias controle com os aumentos dos diferentes tratamentos

(SF, FP1, FP2 e FPD). Posteriormente foram comparados os aumentos das ferremias determinados após as administrações de sulfato ferroso com os determinados após os tratamentos FP1, FP2 e FPD.

O sulfato ferroso é considerado referência, devido a sua elevada biodisponibilidade frente a outros compostos (Hurrell, 1997; Hurrell, 2002), sendo portanto utilizado em estudos cuja finalidade é a de avaliar outras substâncias contendo ferro (Fox et al., 1998; Pizarro et al., 1998; Hurrell et al., 2000; Appel et al., 2001; Mendoza et al., 2001).

Para verificar os aumentos das ferremias e o tempo que permaneceram aumentadas após as administrações de complexo ferro-peptídeo e sulfato ferroso, e comparar com as ferremias controle, realizamos um estudo longitudinal por um período de 720'.

Durante a administração de sulfato ferroso, não houve relatos de efeitos adversos, freqüentes em pacientes que recebem diariamente essa substância para o tratamento ou prevenção da anemia por deficiência de ferro, em doses iguais ou superiores ao administrado no presente estudo e evidenciados em trabalhos com maior duração e freqüência de administração. Não foram observadas também diferenças quanto aos efeitos indesejáveis entre o sulfato ferroso e o complexo ferro-peptídeo.

Ambrósio (1999) verificou que a adesão ao programa de prevenção da anemia, em gestantes, utilizando-se o complexo ferro-peptídeo é maior que quando se utiliza o sulfato ferroso, devido a menor ocorrência de efeitos adversos. A diminuição dos efeitos adversos em complexos contendo ferro foi observada por Coplin et al. (1991) em trabalho realizado com ferro glicina.

A análise estatística das áreas sob as curvas acumuladas, realizada entre os tempos 0'–240'; 240'–720'; 0'–720', sugere que nos primeiros 240' estaríamos verificando os efeitos iniciais da oferta de ferro. Por outro lado, a análise da área obtida entre 240'–720' permite análise dos efeitos tardios da ingestão do ferro. O tempo 240' foi estabelecido para fins de análise, baseado em estudos anteriores que comprovam o aumento da ferremia até esse tempo. O'Neil-Cutting et al. (1987) e Silva (2000) observaram, em seres humanos, com deficiência de ferro, que a ferremia aumenta progressivamente até 180' após a administração de sulfato ferroso por via oral, tempo não avaliado no presente estudo.

Os resultados determinados entre 0'–240' demonstraram diferenças significativas entre as áreas sob as curvas dos tratamentos SFxC ($p < 0,01$) e SFxFP1 ($p < 0,05$), não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre CxFP1, CxFP2, CxFPD, SFxFP2, SFxFPD, FP1xFP2, FPxFPD e FP2xFPD. Entre 240'–720' houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as áreas dos tratamentos SFxFP1 e SFxFPD, porém não houve diferenças significativas entre as demais áreas.

Os resultados verificados entre 0'–240' evidenciam aumentos das áreas sob as curvas decorrentes da administração do sulfato ferroso, quando comparadas com as áreas correspondentes ao tratamento controle, sugerindo que o ferro foi absorvido e como consequência aumentou a ferremia. Não foram evidenciados nesse período aumentos ($p > 0,05$) das áreas, após as administrações do complexo ferro-peptídeo nos tratamentos FP1, FP2 e FPD, quando também se comparou com o tratamento controle.

Os resultados obtidos sugerem que o ferro do complexo ferro-peptídeo não estava livre e, portanto não difundiu para o plasma, como ocorre provavelmente

quando administrado na forma de sulfato ferroso por mecanismo não controlado fisiologicamente. Outra possibilidade seria que para manter a ferremia, em padrão semelhante ao jejum o ferro teria sido liberado em quantidade suficiente, sem a necessidade de mobilizar estoques endógenos.

O ferro do complexo ferro-peptídeo permanece insolúvel durante a sua passagem pelo estômago, devido ao baixo pH. No duodeno torna-se solúvel, porém espera-se que permaneça na forma complexada, o ferro é liberado do complexo por mecanismo ainda não elucidado, para posteriormente ser absorvido pela mesma via de outras formas de ferro não heme. Estudos anteriores realizados por Ambrósio (1999), em mulheres grávidas e por Chaud et al. (2002) em ratos anêmicos mostraram que foi possível tratar e prevenir a anemia ferropriva com o uso de complexo ferro-peptídeo, e demonstraram resultados similares entre o complexo ferro-peptídeo e o sulfato ferroso, contrastando com os verificados no presente estudo, possivelmente por ter sido realizado em homens que não apresentaram deficiência de ferro, sendo nesse caso a absorção do ferro do complexo ferro-peptídeo melhor controlado pelos mecanismos fisiológicos.

O nível de significância, observado quando comparadas as áreas dos tratamentos SFxC ($p < 0,01$) maior que o observado entre SFxFP1 ($p < 0,05$) pode ser decorrente de uma pequena absorção do ferro quando o complexo ferro-peptídeo foi administrado nas mesmas condições. A não evidência de diferença ($p > 0,05$) entre as áreas dos tratamentos SFxFP2 e SFxFPD poderia ser decorrente de uma absorção de ferro maior, ainda que pequena, quando o complexo ferro-peptídeo é administrado em quantidade equivalente de ferro a 80 mg, em jejum ou a 60 mg com dieta, e

comparado com administração equivalente a 60 mg de ferro na forma de sulfato ferroso, em jejum.

A redução observada, em todos os voluntários, no tempo 30' com relação ao tempo zero, em todos os tratamentos, possivelmente seja decorrente da hemodiluição causada pela ingestão de 250 mL de água deionizada.

A comparação, no período de 0'-240', entre os aumentos das ferremias referentes aos tratamentos em cada tempo, demonstrou diferença significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos SFxC nos tempos 60', 120' e 240' confirmando os resultados obtidos na análise realizada considerando-se as áreas acumuladas sob as curvas. Entre os tratamentos SFxFP1 ocorreram diferenças nos tempos 120' ($p < 0,01$) e 240' ($p < 0,05$) indicando que a absorção suposta, decorrente da administração de 60 mg de ferro como complexo ferro-peptídeo teria iniciado 120' após a sua administração. Entre SFxFPD não houve diferença ($p > 0,05$) nos tempos 30', 60' e 120' e as diferenças nos tempos 240' ($p < 0,01$) e 480' ($p < 0,05$), poderia sugerir que a absorção suposta seria favorecida inicialmente nas primeiras duas horas e diminuída posteriormente. Entre SFxFP2 não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em nenhum momento analisado ao se comparar os aumentos das ferremias, provavelmente devido a uma maior absorção de ferro, quando comparada com a administração de complexo ferro-peptídeo, equivalente a 60 mg desse elemento químico.

As suposições feitas anteriormente, relacionadas a absorção do ferro administrado na forma de complexo ferro-peptídeo, ainda que pequena quando comparada com a verificada após a administração de sulfato ferroso, em indivíduos não deficientes só poderão ser elucidadas mediante a administração de complexo

ferro-peptídeo preparado com isótopos estáveis de ferro, não sendo portanto no presente estudo, confirmada essa hipótese.

Silva (2000) obteve um perfil da ferremia semelhante ao obtido no presente estudo, em homens saudáveis, após a administração de sulfato ferroso, em quantidade equivalente a 120 mg de ferro e correspondente ao dobro da utilizada por nós. Verificou ainda um aumento médio na ferremia de 118,5 mg/dL no tempo 240', superior ao obtido em nosso estudo de 51 mg/dL. Esses valores sugerem que a absorção do ferro, administrado na forma de sulfato ferroso, é dose dependente, sendo pouco controlado pelos níveis dos estoques do organismo. Por outro lado, não é possível excluir picos intermediários de ferremia, o que não foi detectado com a metodologia utilizada, no entanto essa possibilidade não parece provável.

Em indivíduos com deficiência de ferro, provavelmente o aumento da ferremia teria sido maior que a verificada em nosso estudo, devido aos mecanismos fisiológicos de controle de absorção. O ferro não absorvido possivelmente seja a causa dos problemas ocasionados pelo sulfato ferroso como diarreia, constipação, modificações da flora fecal (Benoni et al., 1993), aumento de radicais livres nas fezes (Lund et al., 1999), e danos à mucosa intestinal.

Em condições de superdosagem aguda presume-se que a absorção ocorra por processo passivo de primeira ordem (Banner & Tong, 1986). Esse aumento da ferremia não controlado pelo organismo poderia resultar em acúmulo do ferro, fato que torna inadequado o uso do sulfato ferroso nos programas de suplementação nas populações. A absorção do ferro complexado seria melhor regulado pelos estoques de ferro do organismo (Olivares et al., 1997; Jeppsen & Borzelleca, 1999; Pizarro et al. 1998).

Os resultados verificados entre 240'–720' demonstraram não haver diferença significativa entre as áreas das ferremias controle e as determinadas nos tratamentos SF, FP1, FP2 e FPD, sugerindo que nesse período o ferro absorvido durante os 240' iniciais após a administração do sulfato ferroso e que estaria ligado à apotransferrina, foi transferido parcialmente para outros compartimentos, sugere ainda que nesse intervalo de tempo, correspondente a passagem para o intestino grosso o ferro não continuou a ser absorvido, contrariando as observações de Cook et al. (1991).

A análise dos aumentos das áreas entre os tempos 0'–720' demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos SFxC, SFxFP1 e SFxFPD, esse intervalo fornece dados considerando-se o período total, e demonstra não ser possível identificar os tempos em que ocorreram as diferenças entre os tratamentos, devido a tendência que a ferremia apresenta de sofrer alterações em determinados períodos, decorrentes da administração de fontes de ferro, e igualar posteriormente à verificada sem a administração. Portanto, tornou-se imprescindível a análise em cada momento do estudo para se determinar as diferenças ocorridas e comparar os tratamentos.

Os tratamentos FP1, FP2 e FPD não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparados com o controle em nenhum tempo avaliado, sugerindo que em homens saudáveis, o complexo ferro-peptídeo não induz e não favorece aumento significativo da ferremia quando é administrado em jejum e com dieta isenta de inibidores da absorção do ferro até 720' após a administração.

Ao se comparar os aumentos das ferremias decorrentes das administrações de sulfato ferroso e de complexo ferro-peptídeo nas mesmas condições, as diferenças

observadas foram significativas nos tempos 120' ($p < 0,01$), 240' ($p < 0,05$), 480' ($p < 0,05$), demonstrando que quando administrado em homens saudáveis, o sulfato ferroso induz um aumento na ferremia significativamente maior que o induzido pelo complexo ferro-peptídeo.

Os resultados obtidos, demonstram que as hipóteses iniciais de que o complexo ferro-peptídeo induza aumentos significativos das ferremias quando comparados com os aumentos obtidos das ferremias controle e iguais ou superiores aos determinados após as administrações de sulfato ferroso não foram confirmadas em homens saudáveis, não deficientes em ferro, portanto, o fornecimento de complexo ferro-peptídeo, em programas de suplementação, a nível de população, para a prevenção da deficiência de ferro ou anemia ferropriva, poderia ser implementado com segurança, sem o risco de provocar sobrecarga de ferro, porém essa possibilidade somente poderá ser considerada após comprovada a absorção desse elemento, em estudos utilizando-se pessoas deficientes em ferro ou anêmicas, e a redução ou eliminação do efeitos colaterais.

Não foram objetivos do presente trabalho avaliar os possíveis efeitos na mucosa intestinal decorrente da presença do ferro livre ou complexado não absorvido; verificar a ocorrência de sobrecarga de ferro após as administrações prolongadas de sulfato ferroso e complexo ferro-peptídeo; e comparar as alterações na ferremia e nos níveis dos estoques de ferro, decorrentes da administração de complexo ferro-peptídeo, em indivíduos deficientes desse elemento químico. Portanto novos estudos, devem ser realizados, utilizando-se esse composto, para elucidar essas questões.

7 CONCLUSÕES

O complexo ferro-peptídeo, administrado por via oral, em quantidade equivalente a 60 mg ferro, em homens saudáveis, em jejum, não induz aumentos significativos das ferremias, quando comparados com os aumentos determinados sem a administração de ferro, nos respectivos tempos.

O complexo ferro-peptídeo, administrado por via oral, em quantidade equivalente a 80 mg de ferro, em homens saudáveis, em jejum, não induz aumentos significativos das ferremias, quando comparados com os aumentos determinados sem a administração de ferro, nos respectivos tempos.

O complexo ferro-peptídeo, administrado por via oral, em quantidade equivalente a 60 mg de ferro, em homens saudáveis, recebendo dieta isenta de inibidores de absorção de ferro, não induz aumentos significativos das ferremias, quando comparados com os aumentos determinados sem a administração de ferro, nos respectivos tempos.

O sulfato ferroso, administrado por via oral em quantidade equivalente a 60 mg de ferro, em homens saudáveis, em jejum, induz aumentos significativos das

ferremias, quando comparados com os aumentos determinados sem a administração de ferro, nos respectivos tempos.

O aumento da ferremia inicia antes de 60' após a administração de sulfato ferroso por via oral.

O ferro, presente no soro, após 240' da administração de sulfato ferroso, é parcialmente transferido para outros compartimentos do organismo.

O sulfato ferroso, administrado por via oral, em jejum, em quantidade equivalente a 60 mg de ferro, induz aumentos das ferremias, significativamente maiores que os induzidos pela administração de complexo ferro-peptídeo, nos respectivos tempos, nas mesmas condições.

O sulfato ferroso, administrado por via oral, em jejum, em quantidade equivalente a 60 mg de ferro, não induz aumentos significativos maiores que os induzidos pela administração de 80 mg, na forma de complexo ferro-peptídeo, nos respectivos tempos.

O sulfato ferroso, administrado por via oral, em jejum, em quantidade equivalente a 60 mg de ferro, induz aumentos significativos das ferremias maiores que os induzidos pela administração de 60 mg de complexo ferro-peptídeo com dieta, nos respectivos tempos.

ANEXO A

Dieta referente ao tratamento FPD

(60 mg de ferro na forma de complexo ferro-peptídeo + dieta)

Arroz branco (cozido com sal de cozinha, óleo vegetal e condimentos)

– quantidade não limitada

Macarrão com molho ao sugo (sem derivados de leite e sem carne)

– quantidade não limitada

ANEXO B

Aprovação do Comitê de Ética

ANEXO C

QUESTIONÁRIO PARA SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS (PARA HOMENS COM IDADE ENTRE 21 E 50 ANOS)

PESQUISA: *Estudo comparativo da biodisponibilidade do ferro administrado por via oral, nas formas complexo ferro-peptídeo e sulfato ferroso, em indivíduos sadios.*

NOME:
 DATA: TELEFONE:
 PESO: ALTURA: IDADE:
 PRONTUÁRIO:

- 1 – Atividade física intensa diária: menos que 2 horas ()
 mais que 2 horas ()
- 2 – Diarréia sim ()
 não ()
- 3 – Usa medicamentos atualmente sim ()
 não ()
- 4 – Apresenta doença no estômago, pâncreas, intestino, fígado ou vias biliares
 sim ()
 não ()
- 5 – É doador de sangue ou pretende doar sangue sim ()
 não ()
- 6 – Apresenta anemia sim ()
 não ()
- 7 – Apresenta parasitose sim ()
 não ()
- 8 – Apresenta diabetes sim ()
 não ()
- 9 – Apresenta hipertensão sim ()
 não ()
- 10 – Apresenta insuficiência renal sim ()
 não ()
- 11 – Fuma sim ()
 não ()
- 12 – Toma bebidas alcólicas sim ()
 não ()

ANEXO D

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO

NOME: _____ IDADE: _____

DATA DE NASC. ____ / ____ / ____ PROFISSÃO: _____

ENDEREÇO: _____ TEL: _____

1. PROJETO:

Título original: Estudo comparativo da biodisponibilidade do ferro administrado por via oral, nas formas de ferro-peptídeo e sulfato ferroso em indivíduos sadios.

Título definitivo: Estudo comparativo entre os aumentos das ferremias, determinados sem a administração prévia de ferro; após as administrações de sulfato ferroso, e complexo ferro-peptídeo.

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luiz Maçao Sakamoto CRF-SP nº 6.335

3. PROMOTOR DA PESQUISA: Não se aplica.

4. PATROCINADOR QUE APOIA FINANCEIRAMENTE A PESQUISA: Não se aplica.

5. INFORMAÇÕES AO PACIENTE:

5.1. Objetivo: Avaliar a quantidade de ferro que atinge a corrente sanguínea, após tomar por via oral o complexo ferro-peptídeo e comparar com sulfato ferroso, utilizado atualmente para o tratamento da deficiência de ferro.

Justificativa: A avaliação da quantidade de ferro que atinge a corrente sanguínea, após a ingestão do complexo ferro-peptídeo e comparação com o sulfato ferroso em seres humanos, pode contribuir para a adoção de novas formas de tratamento da anemia ferropriva com maior aderência do paciente.

5.2. Para a realização do estudo você virá 5 (cinco) dias em intervalos de 7 (sete) dias à Unidade Metabólica do HCFMRP-USP e cumprirá os seguintes tratamentos:

- 1º tratamento

1 – Alimentar-se com dieta pobre em cálcio e fibras no dia anterior. Não comer fígado e carne vermelha, 72 horas antes;

2 – Permanecer em jejum por um período de 8 (oito) horas (durante o período noturno) exemplo: das 23:00 horas às 7:00 horas;

3 – Coletar 3,0 (três) mililitros (mL) de sangue;

4 – Permanecer em jejum por mais 12 (doze) horas, sendo neste período coletadas amostras de sangue correspondente a aproximadamente 3,0 (três) mL em cada coleta, nos tempos 30 (trinta) minutos, 1 (uma) horas, 2 (duas) horas, 4 (quatro) horas, 8 (oito) horas e 12 (doze) horas da primeira coleta, totalizando aproximadamente 21 (vinte e um) mL de sangue;

5 – Permanecerá em jejum durante todo o período, podendo beber água deionizada.

- 2º tratamento

1 – Alimentar-se com dieta pobre em cálcio e fibras no dia anterior. Não comer fígado e carne vermelha, 72 horas antes;

2 – Permanecer em jejum por um período mínimo de 8 (oito) horas (durante o período noturno) exemplo: das 23:00 horas às 7:00 horas;

3 – Coletar 3,0 (três) mililitros (mL) de sangue;

4 – Tomar 1 (cápsula) contendo 60 mg de ferro, na forma de sulfato ferroso ou complexo ferro-peptídeo, com o auxílio de 250 mL de água deionizada;

5 – Permanecer em jejum por mais 12 (doze) horas, sendo neste período coletadas amostras de sangue correspondente a aproximadamente 3,0 (três) mL em cada coleta, nos tempos 30 (trinta) minutos, 1 (uma) hora, 2 (duas) horas, 4 (quatro) horas, 8 (oito) horas e 12 (doze) horas, após a ingestão do sulfato ferroso ou ferro-peptídeo, totalizando aproximadamente 21 (vinte e um) mL de sangue.

- 3º tratamento

Repetir o 2º tratamento, substituindo o composto. Tomar o complexo ferro-peptídeo caso tenha tomado no 2º tratamento o sulfato ferroso e vice-versa.

- 4º tratamento

1 – Alimentar-se com dieta pobre em cálcio e fibras no dia anterior. Não comer fígado e carne vermelha, 72 horas antes;

2 – Permanecer em jejum por um período mínimo de 8 (oito) horas (durante o período noturno) exemplo: das 23:00 horas às 7:00 horas;

3 – Coletar 3,0 (três) mililitros (mL) de sangue;

4 – Tomar 1 (cápsula) contendo 80 mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com o auxílio de 250 mL de água deionizada;

5 – Permanecer em jejum por mais 12 (doze) horas, sendo neste período coletadas amostras de sangue correspondente a aproximadamente 3,0 (três) mL em cada coleta, nos tempos 30 (trinta) minutos, 1 (uma) hora, 2 (duas) horas, 4 (quatro) horas, 8 (oito) horas e 12 (doze) horas, após a ingestão do sulfato ferroso ou ferro-peptídeo, totalizando aproximadamente 21 (vinte e um) mL de sangue.

- 5º tratamento

1 – Alimentar-se com dieta pobre em cálcio e fibras no dia anterior. Não comer fígado e carne vermelha, 72 horas antes;

2 – Tomar o café da manhã, sem leite, café ou chá; comer somente 2 pães de 50g cada;

3 – Tomar 1 (uma) cápsula contendo 60 mg de ferro, na forma de complexo ferro-peptídeo, com o auxílio de 250 mL de água deionizada;

4 – Coletar aproximadamente 3,0 (três) mL de sangue;

5 – Coletar amostras de sangue correspondente a aproximadamente 3,0 (três) mL em cada coleta, nos tempos 30 (trinta) minutos, 1 (uma) hora, 2 (duas) horas, 4 (quatro) horas após a ingestão de complexo ferro-peptídeo.

6 – Almoçar com dieta pobre em cálcio e fibras, e sem carne;

7 – Coletar amostras de sangue correspondente a aproximadamente 3,0 (três) mL em cada coleta, nos tempos 8 (oito) horas e 12 (doze) horas após a ingestão do complexo ferro-peptídeo, totalizando aproximadamente 21 (vinte e um) mL de sangue.

5.3. Durante os tratamentos poderão ocorrer desconfortos como diarreia, constipação, vômitos, dores abdominais e fome.

5.4. As reações indesejáveis causadas pelo sulfato ferroso são responsáveis em grande parte pelo abandono do tratamento. Espera-se que o complexo ferro-peptídeo não cause os mesmos efeitos e apresente o mesmo resultado, desta forma, haverá maior adesão por parte do paciente.

5.5. Os produtos complexo ferro-peptídeo e sulfato ferroso a serem utilizados no trabalho não provocam danos ao paciente, quando administrados por via oral, em doses diárias terapêuticas recomendadas de 600 a 900 mg de sulfato ferroso, correspondente a 120 – 180 mg de ferro, podem causar desconfortos como diarreia, constipação, vômitos e dores abdominais.

6. Você receberá a importância correspondente às despesas de locomoção, refeições e eventualmente ao dia não trabalhado a ser pago pelo pesquisador.

7. Que o ressarcimento de eventuais despesas, bem como a indenização, a título de cobertura material, para reparação de danos imediatos ou tardios decorrentes da minha participação na pesquisa, serão feitos pelo patrocinador da pesquisa, não cabendo ao HCFMRP-USP, qualquer responsabilidade quanto aos referidos pagamentos.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

ANEXO E

Ferremia em $\mu\text{g/dL}$, em voluntários que ingeriram, após jejum de 480', 3 cápsulas gelatinosas vazias com auxílio de 250 mL de água deionizada, e permaneceram nesta condição até 1200', correspondente ao 1º tratamento (C)

TJ	TC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	DP
480	0	115,60	81,50	87,30	100,00	64,40	100,40	116,30	78,00	127,20	98,80	96,95	17,23
510	30	113,50	71,00	83,90	96,60	61,10	94,10	108,00	77,40	124,90	95,90	92,64	19,75
540	60	113,60	86,80	84,00	100,40	62,40	93,20	108,50	78,20	122,00	90,10	93,92	17,74
600	120	113,40	101,20	85,20	103,80	66,80	101,40	111,60	77,80	139,00	93,50	99,37	20,29
720	240	100,30	142,20	88,80	117,70	85,90	108,60	121,50	86,30	150,60	94,10	109,60	23,13
960	480	74,30	200,80	120,30	146,40	129,40	126,40	137,40	122,50	185,30	117,60	136,04	35,66
1200	720	54,80	206,40	119,20	144,00	161,10	119,50	155,80	120,10	204,00	113,70	139,86	45,23
Média		97,93	127,13	95,53	115,56	90,16	106,23	122,73	91,47	150,43	100,53	109,77	25,58
DP		24,02	56,96	16,64	21,34	39,61	12,66	17,77	20,62	32,19	10,71	20,05	-

TJ = Tempo em minutos de permanência em jejum

TC = Tempo em minutos após o início das coletas das amostras

DP = Desvio padrão

ANEXO F

Ferremia em $\mu\text{g/dL}$, em voluntários que ingeriram, após jejum de 480', 60 mg de ferro na forma de sulfato ferroso acondicionados em cápsulas gelatinosas, com auxílio de 250 mL de água deionizada e permaneceram nesta condição até 1200', correspondente ao 2º tratamento para os voluntários ímpares e 3º tratamento para os voluntários pares (SF)

TJ	TC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	DP
480	0	113,70	96,00	81,00	121,00	65,90	106,20	109,30	76,10	135,40	92,00	99,66	21,55
510	30	107,10	90,00	83,50	113,80	60,80	102,20	105,80	72,20	134,70	87,50	95,76	21,45
540	60	137,00	116,60	94,20	134,80	94,30	103,00	109,30	83,90	160,60	98,50	113,22	24,04
600	120	154,10	134,00	116,60	169,10	117,40	124,50	120,80	99,20	181,60	113,20	133,05	26,62
720	240	157,80	139,70	154,40	198,90	129,60	141,50	150,80	115,50	193,00	128,80	151,00	26,96
960	480	94,80	143,40	183,00	199,80	142,30	151,20	172,20	142,80	194,10	177,10	160,07	31,49
1200	720	55,30	133,30	173,50	149,70	151,00	127,30	177,40	146,20	200,80	187,20	150,17	40,88
Média		117,11	121,86	126,60	155,30	108,76	122,27	135,09	105,13	171,46	126,33	128,99	20,44
DP		36,16	21,49	43,28	35,17	35,97	19,44	31,10	30,62	28,01	40,66	26,23	-

TJ = Tempo em minutos de permanência em jejum

TC = Tempo em minutos após o recebimento de 60 mg de ferro na forma de sulfato ferroso

DP = Desvio padrão

ANEXO G

Ferremia em $\mu\text{g/dL}$, em voluntários que ingeriram, após jejum de 480', 60 mg de ferro na forma de complexo ferro-peptídeo, acondicionados em cápsulas gelatinosas, com auxílio de 250 mL de água deionizada e permaneceram nesta condição até 1200', correspondente ao 3º tratamento para os voluntários ímpares e 2º tratamento para os voluntários pares (FP1)

TJ	TC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	DP
480	0	111,30	86,30	82,20	136,60	64,40	105,00	110,10	79,00	117,90	93,20	98,60	20,38
510	30	108,30	82,10	84,80	132,50	62,40	99,60	101,30	74,60	116,40	89,10	95,11	19,71
540	60	103,40	90,10	85,10	132,80	64,20	107,00	103,90	76,30	122,30	88,50	97,36	20,74
600	120	96,00	115,90	89,60	132,70	70,80	110,40	104,60	76,90	129,00	84,90	101,08	21,13
720	240	83,00	168,30	107,70	131,20	90,40	119,00	109,30	86,90	152,50	91,40	113,97	29,01
960	480	52,60	235,40	156,50	109,90	110,90	144,10	125,70	127,70	155,00	103,90	132,17	47,20
1200	720	50,30	260,50	147,80	80,20	133,00	147,30	143,80	153,30	198,20	103,70	141,81	55,83
Média		86,41	148,37	107,67	122,27	85,16	118,91	114,10	96,39	141,61	93,53	111,44	29,71
DP		25,61	74,43	31,62	20,54	27,60	19,24	15,35	31,27	29,52	7,47	18,69	-

TJ = Tempo em minutos de permanência em jejum

TC = Tempo em minutos após o recebimento de 60 mg de ferro na forma de complexo ferro-peptídeo

DP = Desvio padrão

ANEXO H

Ferremia em $\mu\text{g/dL}$ em voluntários que ingeriram, após jejum de 480', 80 mg de ferro na forma de complexo ferro-peptídeo, acondicionados em cápsulas gelatinosas, com auxílio de 250 mL de água deionizada e permaneceram nesta condição até 1200', correspondente ao 4º tratamento (FP2)

TJ	TC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	DP
480	0	99,40	94,80	97,60	90,80	64,60	112,50	117,30	73,50	133,80	76,50	96,08	21,26
510	30	90,80	86,60	89,20	90,60	61,50	107,20	117,70	74,20	136,40	80,70	93,49	21,74
540	60	92,40	89,60	91,40	93,20	68,70	110,40	124,00	71,50	144,60	81,10	96,69	23,56
600	120	90,60	100,30	83,40	104,40	71,10	119,40	134,50	78,00	152,10	90,50	102,43	25,85
720	240	93,70	133,80	100,40	152,40	111,10	132,90	146,80	82,80	159,90	115,10	122,89	26,23
960	480	97,20	129,80	140,40	158,90	177,60	148,50	163,30	111,00	170,20	149,90	144,68	25,72
1200	720	72,30	128,20	167,40	159,90	246,80	121,90	153,70	109,70	156,30	141,10	145,73	45,51
Média		90,91	109,01	109,97	121,45	114,48	121,82	136,75	85,81	150,47	104,98	114,56	19,46
DP		8,83	20,70	31,49	33,71	71,62	14,55	18,26	17,15	13,07	30,56	23,09	-

TJ = Tempo em minutos de permanência em jejum

TC = Tempo em minutos após o recebimento de 80 mg de ferro na forma de complexo ferro-peptídeo

DP = Desvio padrão

ANEXO I

Ferremia em $\mu\text{g/dL}$, em voluntários que ingeriram, após jejum de 480', 60 mg de ferro na forma de complexo ferro-peptídeo acondicionados em cápsulas gelatinosas, com auxílio de 250 mL de água deionizada e receberam dieta, permanecendo nesta condição até 1200', correspondente ao 5º tratamento (FPD)

TJ	TC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	DP
480	0	112,40	91,30	80,60	88,90	66,30	99,60	90,80	92,40	112,10	84,60	91,90	13,88
510	30	102,90	96,00	75,80	86,50	61,10	95,40	98,50	91,80	119,40	80,40	90,78	16,00
540	60	98,80	102,20	81,40	86,70	65,60	98,20	104,60	89,60	124,60	84,90	93,66	15,90
600	120	93,50	109,70	87,40	88,90	66,90	118,60	115,40	93,10	129,40	95,50	99,84	18,34
720	240	82,10	119,00	88,10	97,10	73,20	133,30	131,60	97,30	140,50	110,60	107,28	23,30
960	480	58,80	130,90	119,30	120,60	76,40	161,00	140,40	111,30	162,60	146,80	122,81	33,98
1200	720	45,60	108,30	101,80	111,50	78,50	137,40	132,20	114,20	174,80	115,50	111,98	34,42
Média		84,87	108,20	90,63	97,17	69,71	120,50	116,21	98,53	137,63	102,61	102,606	19,29
DP		24,43	13,56	15,10	13,62	6,38	24,68	19,02	10,01	23,21	23,68	11,97	-

TJ = Tempo em minutos de permanência em jejum

TC = Tempo em minutos após o recebimento de 60 mg de ferro na forma de sulfato ferroso

DP = Desvio padrão

ANEXO J

Glicemias, em mg/dL, observadas no 1º tratamento (C), no período correspondente às coletas das amostras, nos voluntários após jejum de 8 horas e que se prolongou por mais 12 horas

Tempo em minutos	TJ	480	495	510	540	600	720	960	1200	Média	Desvio padrão
	TC	0	15	30	60	120	240	480	720		
Voluntários	1	93,70	95,20	94,50	95,70	93,50	90,30	87,90	85,80	92,07	3,65
	2	80,90	80,50	78,90	79,60	83,40	80,10	82,70	79,40	80,68	1,59
	3	79,70	76,60	74,40	78,00	74,10	75,50	73,20	77,30	76,10	2,20
	4	94,20	94,30	96,70	93,40	90,20	91,10	88,30	87,20	91,92	3,27
	5	91,70	91,70	91,60	85,30	87,20	85,30	82,80	81,20	87,10	4,18
	6	89,70	91,00	92,50	93,10	92,10	89,50	87,20	86,60	90,20	2,41
	7	99,80	100,00	99,40	99,40	95,30	91,30	88,50	87,00	95,08	5,43
	8	93,70	87,60	90,40	88,80	91,10	89,10	93,60	94,20	91,06	2,52
	9	95,70	96,00	95,00	91,60	86,40	87,60	91,20	87,80	91,40	3,87
	10	91,20	94,10	93,60	91,70	94,00	94,80	91,80	89,40	92,57	1,84
	MD	91,03	90,70	90,70	89,60	88,70	87,46	86,72	85,59	88,82	2,04
	DP	6,29	7,24	7,90	6,84	6,35	5,76	5,91	5,00	5,94	-

TJ = Tempo total em minutos de permanência em jejum

TC = Tempo em minutos após início das coletas, com oito horas de jejum

MD = Média

DP = Desvio padrão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, L. H. Pregnancy and iron deficiency: unresolved issues. *Nutr Rev*, v.55, n.4, p.91-101, 1997.

AMBRÓSIO, V. L. S. *Avaliação do complexo ferro-peptídeo como fonte alternativa para fornecimento de ferro a gestantes*. Ribeirão Preto, 1999. 97p.
Dissertação Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

ANDERSON, A. C. Iron poisoning in children. *Curr Opin Pediatr*, v.6, p. 289-94, 1994.

ANDRACA, I.; CASTILLO, M.; WALTER, T. Psychomotor development and behavior in iron-deficient anemic infants. *Nutr Rev*, v.55, n.4, p.125-32, 1997.

ANDREWS, N. C. Medical progress: disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, v.341, n.26, p.1986-95, 1999.

ANGELIS, R. C. Digestão e absorção de nutrientes. In: DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. *Ciências Nutricionais*. São Paulo: Sarvier, 1998. cap. 1, p. 3-17.

APPEL, M. J.; KUPER, C. F.; WOUTERSEN, R. A. Disposition, accumulation and toxicity of iron fed as iron (II) sulfate or as sodium iron EDTA in rats. *Food Chem Toxicology*, v.39, p.261-69, 2001.

BANNER, W. JR., TONG, T. G. Iron poisoning. *Pediatr Clin North Am*, v.33, n.2, p.393-409, 1986.

BATRA, V.; BHOWMICK, A.; BEHERA, B. K.; RAY, A. R. Sustained release of ferrous sulfate from polymer-coated gum arabica pellets. *J Pharm Sci*, v.83, n.5, p.632-5, 1994.

BAYNES, R. D.; STIPANUK, M. H. Iron. In: STIPANUK, M. H. *Biochemical and Physiological aspects of human nutrition*. Philadelphia: Saunders, 2000, cap.31, p. 711-40.

BEARD, J. L.; CONNOR, J. D.; JONES, B. C. Brain iron: location and function. *Prog Food Nutr Sci*, v.17, n.3, p.183-221, 1993.

BEARD, J. L.; DAWSON, H.; PINERO, D. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr Rev*, v.54, p.183-221, 1996.

BJÖRN-RASMUSSEN, E.; HALLBERG, L.; ROSSANDER, L. Absorption of 'fortification' iron. Bioavailability in man of different samples of reduced Fe, and prediction of the effects of Fe fortification. *Br. J. Nutr.*, v.37, p.375-88, 1977.

BENJAMIN, B. I.; CORTELL, S.; CONRAD, M. E. Bicarbonate induced iron complexes and iron absorption: one effect of pancreatic secretions. *Gastroenterol*, v.53, p.389-96, 1967.

BENONI, G.; CUZZOLIN, L.; ZAMBRERI, D.; DONINI, M.; DEL SOLDATO, P.; CARAMAZZA, I. Gastrointestinal effects of single and repeated doses of ferrous sulphate in rats. *Pharmacol Res*, v.27, n.1, p.73-80, 1993.

BOLDT, D. H. New perspectives on iron: an introduction. *Am J Med Sci*, v.318, n.4, p.207-12, 1999.

BÖNI, R. E.; HUCH BONI, R. A.; GALBRAITH, R. A.; DRUMMOND, G. S.; KAPPAS, A. Tin-mesoporphyrin inhibits heme oxygenase activity and heme-iron absorption in the intestine. *Pharmacology*, v.47, n.5, p.318-29, 1993.

BOTHWELL, M. A.; WILSON, W. H.; SHOOTER, E. M. The relationship between glandular kallikrein and growth factor-processing proteases of mouse submaxillary gland. *J Biol Chem*, v.254, n.15, p.7287-94, 1979.

BUDAVARI, S. *The Merck Index*. 12 ed. Whitehouse Station: Merck & Co, 1996.

CALLENDER, S. T.; MALLETT, B. J.; SMITH, M. D. Absorption of haemoglobin iron. *Br J Haematol*, v.3, p.186-192, 1957.

CASTRO, S.; GONZALEZ-VILLARON, L.; GONZALEZ DE BUITRAGO, J. M.; PEREZ-ARELLANO, J. L. Circadian rhythm of plasma iron concentration and beta-adrenergic blockade. *Am J Haematol*, v.49, n.3, p.254-5, Jul. 1995.

CHAUD, M. V. *Complexo ferro-peptídeo: uma alternativa para aumentar a biodisponibilidade do ferro*. Ribeirão Preto, 1993, p.87. Dissertação Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

CHAUD, M. V.; IZUMI, C.; NAHAAL, Z.; SHUHAMA, T.; BIANCHI, M. L.; FREITAS, O. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. *J Agric Food Chem*, v.50, n.4, p.871-7, 2002.

CONNOR, S. L.; GUSTAFSON, J. R.; SEXTON, G.; BECKER, N.; ARTAUD-WILD, S.; CONNOR, W. E. The diet habit survey: a new method of dietary assessment that relates to plasma cholesterol changes. *J Am Dietetic Assoc*, v.92, p.41-47, 1992.

CONRAD, M. E.; UMBREIT, J. N.; MOORE, E. G. Iron absorption and transport. *Am J Med Sci*, v.318, n.4, p.213-29, 1999.

CONRAD, M. E.; WEINTRAUB, L. R.; SEARS, D. A.; CROSBY, W. H. Absorption of hemoglobin iron. *Am J Physiol*, v.211, n.5, p.1123-30, 1966.

COOK, J. D.; MINNICH, V.; MOORE, C. V.; RASMUSSEN, A.; BRADLEY, W. B.; FINCH, C. A. Absorption of fortification iron in bread. *Am J Clin Nutr*, v.26, n.8, p.861-72, 1973.

COOK, J. D.; CARRIAGA, M.; KAHN, S. G.; SCHALCH, W.; SKIKNE, B. S. Gastric delivery system for iron supplementation. *Lancet*, v.335, n.8698, p.1136-9, 1990.

COOK, J. D.; DASSENKO, S. A.; LYNCH, S. R. Assessment of the role of nonheme-iron availability in iron balance. *Am J Clin Nutr*, v.54, n.4, p.717-22, 1991.

COOK, J. D.; LIPSCHITZ, D. A.; LAUGHTON, E. M. M. Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. *Am J Clin Nutr*, v.27, p.681-687, 1974.

COPLIN, M.; SCHUETTE, S.; LEICHTMANN, G.; LASHNER, B. Tolerability of iron: a comparison of bis-glycino iron II and ferrous sulfate. *Clin Ther*, v.13, n.5, p.606-12, 1991.

CREMONESI, P.; CARAMAZZA, I. Chemical and biological characterization of iron-protein succinylate (ITF 282). *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, v.31, n.1, p.40-51, 1993.

CUNHA, D. F.; CUNHA, S. F. C. Microminerais. In: DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. *Ciências Nutricionais*. São Paulo: Sarvier, 1998. p. 141-65.

DALLMAN, P. R. Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Annu Rev Nutr*, v.6, p.13-40, 1986.

DARNTON-HILL, I. Developing industrial-governmental-academic partnerships to address micronutrient malnutrition. *Nutr Rev*, v.55, n.3, p.76-81, 1997.

DAWSON, E. B.; DAWSON, R.; BEHRENS, J.; DE-VORA, M. A.; MCGANITY, W. J. Iron in prenatal multivitamin/multimineral supplements. *J Reprod Med*, v.43, p.133-40, 1998.

DEXTER, D. T.; CARAYON, A.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y.; WELL, F. R.; DANIEL, S. E.; LEES, A. J.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain*, v.114, p.1953-75, 1991.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; FREITAS, M. L.; FERREIRA, J. F.; GONÇALVES, A. L., MARCHINI, J. S. Iron from complex salts and its bioavailability to rats. *Int J Vitam Nutr Res*, v.65, n.4, p.272-5, 1995.

EL-SHOBAKI, F. A.; RUMMEL, W. Mucosal transferrin and ferritin factors in the regulation of iron absorption. *Res Exp Med*, v.171, p.243-53, 1977.

FAIRBANKS, V. F.; BEUTLER, E. Iron metabolism. In: BEUTLER, E. *Williams hematology*. 6thed., USA: McGraw-Hill, 2001, cap.38, p.447-70.

FAIRBANKS, V. F.; KLEE, G. G. Aspectos bioquímicos da hematologia. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. *Tietz Fundamentos de Química Clínica*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 36, p. 681-706.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed., Parte I, São Paulo: Atheneu, 1988, p. V.1.4.1.

FINCH, C. A.; COOK, J. D. Iron deficiency. *Am J Clin Nutr*, v.39, n.3, p.471-7, 1984.

FINCH, C. A.; DEUBELBEISS, K.; COOK, J. D.; ESCHBACH, J. W.; HARKER, L. A.; FUNK, D. D.; MARSAGLIA, G.; HILLMAN, R. S.; SLICHTER, S.; ADAMSON, J. W.; GANZONI, A.; BIBLETT, E. R. Ferrokinetics in man.

Medicine, v.49, n.1, p.17-53, 1970.

FLEMING, M. D.; TRENOR, C.C. 3rd; SU, M. A.; FOERNZLER, D.; BEIER, D. R.; DIETRICH, W. F.; ANDREWS, N. C. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*, v.16, n.4, p.383-6, 1997.

FOX, T. E.; EAGLES, J.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant foods. *Am J Clin Nutr*, v.67, n.4, p.664-8, 1998.

FREIRE, W. B. Hemoglobin as a predictor of response to iron therapy and its use in screening and prevalence estimates. *Am J Clin Nutr*, v.50, n.6, p.1442-9, 1989.

FREIRE, W. B. Strategies of the Pan American Health Organization/World Health Organization for control of iron deficiency in Latin America. *Nutr Rev*, v.55, n.6, p.183-8, 1997.

FREITAS, M. L. S. Carência de ferro na infância - proposta de prevenção e controle. Ribeirão Preto, 1996. 98p. *Tese (Doutorado)*. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

FREITAS, O.; PADOVAN, G. J.; VILELA, L.; DOS SANTOS, J. E.; DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; GREENE, L. J. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. *J Agric Food Chem*, v.41, p.1432-38, 1993.

GIBSON, R. S. Technological approaches to combatting iron deficiency. *Eur J Clin Nutr*, v.51, p.25-7, 1997. Supplement 4S.

GREEN, R.; CHARLTON, R.; SEFTEL, H.; BOTHWELL, T. H.; MAYET, F. Body iron excretion in man. A collaborative study. *Am J Med*, v.45, n.3, p.336-53, 1968.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Digestão e absorção no trato gastrointestinal. In: ____ *Tratado de Fisiologia Médica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap. 32, p. 751-61.

HAAS, J. D.; BROWNLIN, T. 4 TH. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J Nutr*, v. 131, p.676S-690S, Supplement, 2001.

HALIOTIS, F. A.; PAPANASTASIOU, D. A. Comparative study of tolerability and efficacy of iron protein succinylate versus iron hydroxide polymaltose complex in the treatment of iron deficiency in children. *Int J Clin Pharmacol Ther*, v.36, n.6, p.320-5, 1998.

HALLBERG, L. Results of surveys to assess iron status in Europe. *Nutr Rev*, v.53, n.11, p.314-22, 1995.

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ROSSANDER, L. Low bioavailability of carbonyl iron in man: studies on iron fortification of wheat flour. *Am J Clin Nutr*, v.43, n.1, p.59-67, 1986.

HALLBERG, L.; HULTHEN, L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am J Clin Nutr*, v.71, p.1147-60, 2000.

HALLBERG, L.; SANDSTRÖM, B.; RALPH, A.; ARTHUR, J. Iron, zinc and other trace elements. In: GARROW, J. S.; JAMES, W. P. T.; RALPH, A. *Human nutrition and dietetics*. 10th.ed. London: Harcourt, 2000, cap. 12, p.177-92.

HALLBERG, L.; SÖLVELL, L. Absorption of hemoglobin iron in man. *Acta Med Scand*, v.181, n.3, p.335-54, 1967.

HEMMELER, P. G. Nouvelles recherches sur le métabolisme du fer les oscillations du fer sérique dans la journée. *Helvet Med Acta*, v.11, p.201-07, 1944.

HEYMSFIELD, S. B.; BAUMGARTNER, R. N.; PAN, S. Nutritional assessment of malnutrition by anthropometric methods. In: SHILLS, M. E., et al. *Modern Nutrition Health and Disease*. 9th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1999, p.903-21.

HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E.; MOSS, P. A. H. *Essential haematology*. 4th ed. United Kingdom: Blackwell Science, 2001, p.22 e 36.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. *Nonparametric statistical methods*. New York, John Wiley & Sons, 1973.

HUNT, J. M. Reversing productivity losses from iron deficiency: the economic case. *J Nutr*, v.132, n.4, p.794S-801S, Supplement, 2002.

HURRELL, R. F. Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutr Rev*, v.55, n.6, p.210-22, 1997.

HURRELL, R. F.; REDDY, M. B.; BURRI, J.; COOK, J. D. An evaluation of EDTA compounds for iron fortification of cereal-based foods. *Br J Nutr*, v.84, p.903-910, 2000.

HURRELL, R. F. Fortification: overcoming technical and practical barriers. *J Nutr*, v.132, n.4, p.806S-12S, Supplement, 2002.

INTERNATIONAL NUTRITIONAL ANEMIA CONSULTATIVE GROUP.

INACG Symposium. 12 March 1999, Durban South Africa, p.1-60. ILSI Research Foundation, Washington, 2000.

IOST, C.; NAME, J. J.; JEPPSEN, R. B.; ASHMEAD, H. W. Repleting hemoglobin in iron deficiency anemia in young children through liquid milk fortification with bioavailable iron amino acid chelate. *J Am Coll Nutr*, v.17, n.2, p.187-94, 1998.

JENNER, P. Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, v.136, p.6-15, 1991.

JEPPSEN, R. B.; BORZELLECA, J. F. Safety evaluation of ferrous bisglycinate chelate. *Food Chem Toxicol*, v.37, n.7, p.723-31, 1999.

KERR, D. M. S.; DAVIDSON, S. Gastrointestinal intolerance to oral iron preparation. *Lancet*, v.II, p.19, 1958.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. 9. ed. Obra Didática, 2002.

LAYRISSE, M.; GARCIA-CASAL, M. N. Strategies for the prevention of iron deficiency through foods in the household. *Nutr Rev*, v.55, n.6, p.233-9, 1997.

LIEBERMAN, E.; RYAN, K. J.; MONSON, R. R.; SHOENBAUM, S. C.

Association of maternal hematocrit with premature labor. *Am J Obstet Gynecol*, v.159, p.107-14, 1988.

LOOKER, A. C.; DALLMAN, P. R.; CARROLL, M. D.; GUNTER, E. W.;

JOHNSON, C. L. Prevalence of iron deficiency in the United States. *Jama*, v.277, n.12, p.973-6, 1997.

LOPES-ALEGRIA; SCHOR, N.; SIQUEIRA, A.A.F. Gravidez na adolescência: estudo comparativo. *Rev Saúde Pública*, v.23, n.6, p.473-77, 1989.

LOZOFF, B.; JIMENEZ, E.; WOLF, A. B. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *N Eng J Med*, v.325, n.10, p.687-94, 1991.

LOZOFF, B.; KELEIN, N. K.; NELSON, E. C.; McCLISH, D. K.; MANUEL, M.; CHACON, M. E. Behavior of infants with iron deficiency anemia. *Child Devel*, v.69, n.1, p.24-36, 1998.

LUND, E. K.; WHARF, S. G.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; JOHNSON, I. T.

Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers. *Am J Clin Nutr*, v.69, p.250-5, 1999

LYNCH, S. R.; SIMON, M.; BOTHWELL, T. H.; CHARLTON, R. W. Circadian variation in plasma iron concentration and reticuloendothelial iron release in the rat. *Clin Sci Mol Med*, v.45, n.3, p.331-6, 1973.

MATTHEW, J. N. S.; ALTMAN, D. G.; CAMPBELL, M. J.; ROYSTOM, P. Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J*, v.300, p.230-5, 1990

MENDOZA, C.; VITERI, F. E.; LÖNNERDAL, B.; RABOY, V.; YOUNG, K. A.; BROWN, K. H. Absorption of iron from unmodified maize and genetically altered, low-phytate maize fortified with ferrous sulfate or sodium iron EDTA. *Am J Clin Nutr*, v.73, p.80-5, 2001.

MONTEIRO, C. A.; SZARFARC, S. C.; MONDINI, L. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Rev Saúde Pública*, v. 34, n.6 supl., p.62-72, 2000

OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; PINEDA, O.; NAME, J. J.; HERTRAMPF, E.; WALTER, T. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. *J Nutr*, v.127, n.7, p.1407-11, 1997.

O'NEIL-CUTTING, M. A.; CROSBY, W. H. Blocking of iron absorption by a preliminary oral dose of iron. *Arch Intern Med*, v.147, n.3, p.489-91, 1987.

PHILPOTT, C. C. Molecular aspects of iron absorption: Insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hepatology*, v.35, n.5, p.993-1001, 2002.

PIETRANGELO, A.; ROCCHI, E.; CASALGRANDI, G.; et al. Regulation of transferrin, transferrin receptor, and ferritin genes in human duodenum. *Gastroenterol*, v.102, p.802-9, 1992.

PINEDA, O.; ASHMEAD, H. D. Effectiveness of treatment of iron-deficiency anemia in infants and young children with ferrous bis-glycinate chelate. *Nutrition*, v.17, n.5, p.381-4, 2001.

PIZARRO, F.; BIOCH, R. U.; OLIVARES, M.; ALMEIDA, C.; BIOCH, M. L. D.; CARMUEGA, E.; O'DONNELL, A.; VALENCIA, M. E. Iron absorption of ferric glycinate is controlled by iron stores. *Nutr Res*, v.18, n.1, p.3-9, 1998.

POLLITT, E. Iron deficiency and educational deficiency. *Nutr Rev*, v.55, n.4, p.133-41, 1997.

PONKA, P.; BEAUMONT, C.; RICHARDSON, D. R. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol*, v.35, n.1, p.35-54, 1998.

PREZIOZI, P.; PRUAL, A.; GALAN, P.; DAOUDA, H.; BOUREIMA, H.; HERCBERG, S. Effect of iron supplementatation on the iron status of pregnant women: consequences for newborns. *Am J Clin Nutr*, v.66, n.5, p.1178-82, 1997.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. Formas farmacêutica obtidas por divisão mecânica. In: *Técnica farmacêutica e farmácia galénica*. 4 ed. v.1, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1991.

RAFFIN, S. B.; WOO, C. H.; ROOST, K. T.; PRICE, D. C.; SCHMID, R. Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *J Clin Invest*, v.54, n.6, p.1344-52, Dec. 1974.

RASSMUSSEN, K. Is there a causal relationship between iron deficiency or iron-deficiency anemia and weight at birth, length of gestation and perinatal mortality ? *J Nutr*, v.131, n.25-2, p.590S-603S, Supplement, 2001.

REYNOLDS, J. E. S. *Martindale the Extra Pharmacopéia*. 29 ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1989, p.1189-95.

RIEDEL, H. D.; REMUS, A. J.; FITSCHER, B. A.; STREMMEL, W. Characterization and partial purification of a ferrireductase from human duodenal microvillus membranes. *Biochem J*, v.309, n.Pt3, p.745-8, 1995.

ROE, M. A.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. High bioavailability of reduced iron added to uk flour. *Lancet*, v.353, p.1938-39, 1999.

SAVIN, M. A.; COOK, J. D. Mucosal iron transport by rat intestine. *Blood*, v.56, n.6, p.1029-35, Dec. 1980.

SHARP, P.; TANDY, S.; YAMAJI, S.; TENNANT, J.; WILLIAMS, M.; SRAI, S. K. S. Rapid regulation of divalent metal transporter (DMT1) protein but not mRNA expression by non-haem iron in human intestinal Caco-2 cells. *Febs Lett*, v.510, n.1-2; p.71-6, 2002.

SHEARD, N. F. Iron deficiency and infant development. *Nutr Rev*, v.52, n.4, p.137-40, 1994.

SHEEHAN, R.; FRENKEL, E. P. The control of iron absorption by the gastrointestinal mucosal cell. *J Clin Invest*, v.51, p.224-31, 1972.

SILVA, L. F. *Curvas sanguíneas de ferro após a administração oral de diferentes sais de ferro em homens adultos*. Araraquara, 2000. 71p. Dissertação Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita e Filho.

SIEGEL, S. *Estatística não Paramétrica para a Ciência do Comportamento*. São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, 1975.

SILVA, L. S. M.; GIUGLIAN, E. R. J.; AERTS, D. R. G. C. Prevalência e determinantes de anemia em crianças de Porto Alegre, RS, Brasil. *Rev Saúde Pública*, v.35, n.1, 2001.

SIMMONS, W. K.; COOK, J. D.; BINGHAM, K. C.; THOMAS, M.; JACKSON, J.; JACKSON, M.; AHLUWALIA, N.; KAHN, S. G.; PATTERSON, A. W.

Evaluation of a gastric delivery system for iron supplementation in pregnancy. *Am J Clin Nutr*, v.58, n.5, p.622-6, 1993.

SIMPSON, R. J.; RAJA, K. B.; PERUZZI, M.; CREMONESI, P. Absorption of iron from iron succinyl-protein complexes by mouse small intestine. *J Pharm Pharmacol*, v.43, n.6, p.338-91, 1991.

SINGH, K.; FONG, Y. F.; ARULKUMARAN, S. Anemia in pregnancy – a cross sectional study in Singapore. *Eur J Clin Nutr*, v.52, n.1, p.65-70, 1998.

SMITH, C.; MITCHINSON, M. J.; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J*, v.286, n.pt3, p.901-5, 1992.

STENGLE, J. M.; SCHADE, A. L. Diurnal-nocturnal variations of certain blood constituents in normal human subjects: plasma iron, siderophilin, bilirubin, copper, total serum protein and albumin, haemoglobin and haematocrit. *Brit J Haemat*, v.3, p.117-124, 1957.

STOLTZFUS, R. J. & DREYFUSS, M. L. Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. International Nutritional Anemia Consultative Group (INACG)/WHO/UNICEF. *World Health Organization*, Geneva, Switzerland, 1998.

STOOKEY, L. L. Ferrozine – a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, v.42, n.7, p.779-81, 1970.

SUBCOMMITTEE IN THE TENTH EDITION OF THE RDAS FNB. *Recommended dietary allowances*. 10 th rev ed. Washington, DC, National Academy Press, 1989.

SZARFACS, S. C.; DE SOUZA, S. B. Prevalência e fatores de risco na deficiência de ferro e anemia. *Arch Latinoam Nutr*, v.47, n.2, p.35-8, 1997.

TAYLOR, P.; MARTÍNEZ-TORRES, C.; LEETS, I.; RAMÍREZ, J.; GARCÍA-CASAL, M. N.; LAYRISSE, M. Relationships among iron absorption, percent saturation of plasma transferrin and serum ferritin concentration in humans. *J Nutr*, v.118, n.9, p.1110-5, 1988.

THORSTENSEN, K.; ROMSLO, I. The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake. *Biochem J*, v.27, n.1, p.1-9, 1990.

UCHIDA, R.; AKITSUKI, T.; KIMURA, H.; TANAKA, T.; MATSUDA, S.; KARIYONE, S. Relationship among plasma iron, plasma iron turnover, and reticuloendothelial iron release. *Blood*, v.61, n.4, p.799-802, 1983.

UZEL, C.; CONRAD, M. E. Absorption of heme iron. *Semin Hematol*, v.35, n.1, p.27-34, 1998.

WALTER, T; OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; MUÑOZ, C. Iron, anemia, and infection. *Nutr Rev*, v.55, n.4, p.111-24, 1997.

WESSLING-RESNICK, M. Iron transport. *Annu Rev Nutr*, v.20, p.129-51, 2000

WHEBY, M. S.; SUTTLE, G. E.; FORD, K. T3rd. Intestinal absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterol*, v.58, n.5, p.647-54, 1970.

WHEBY, M. S.; UMPIERRE, G. Effect of transferrin saturation on iron absorption in man. *N Engl J Med*, v.271, n.27, p.1391-95, 1964.

WILTINK, W. F.; KRUIHOF, J.; MOL, C.; BOS, M. G.; VAN EIJK, H. G. Diurnal and nocturnal variations of the serum iron in normal subjects. *Clin Chim Acta*, v.49, n.1, p.99-104, 1973.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – *Nutrition progame (nut), malnutrition worldwide* – Iron deficiency anaemia. [<http://www.who.int/nut/malnutrition>] 1998, p.7-8.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The prevalence of anaemia in women: a tabulation of available information, 2.ed. Geneva: WHO, 1992, p.5-12.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/UNU/UNICEF. Master protocol. Population studies of the relative effectiveness of weekly and daily iron supplementation in pregnant women, adolescent girls and preschool-age children. Geneva, WHO, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/UNU/UNICEF. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control; a guide for programme managers, 2001. Disponível em: [<http://www.micronutrient.org/idpas/pdf/731|DAAssessment.pdf>] Acesso em: 14/03/2003.

YIP, R. The challenge of improving iron nutrition: limitations and potentials of major intervention approaches. *Eur J Clin Nutr*, v.51 (s 4), p.16-24, 1997.

YIP, R.; RAMAKRISHNAN, U. Experiences and challenges in developing countries. *J Nutr*, v.132, n.4, p.827S-30S, Supplement, 2002.

YOUNG, G. P.; ROSE, I. S.; ST-JOHN, J. B. Haem in the gut. I. Fate of haemoproteins and the absorption of haem. *J Gastroenterol Hepatol*, v.4, p.537-45, 1989.