

Iron absorption from infant formula and iron-fortified cow's milk: experimental model in weanling rats

Absorção do ferro da fórmula para lactentes e do leite de vaca fortificado: modelo experimental em ratos recém-desmamados

Mariana de L. Costa¹, Karine de C. Freitas², Olga M. S. Amancio³,
Ângela T. Paes⁴, Sylvia M. A. da Silva⁵, Jacqueline Luz⁶, Mauro B. de Moraes⁷

Resumo

Objetivo: Comparar a absorção do ferro da fórmula de partida e do leite de vaca integral fortificado.

Métodos: Foram utilizados 24 ratos machos Wistar recém-desmamados, mantidos em gaiolas metabólicas durante todo o período do experimento (10 dias). No primeiro dia, os animais foram distribuídos em três grupos semelhantes quanto ao peso, comprimento, hematócrito e hemoglobina: 1) fórmula de partida para lactentes; 2) leite de vaca integral em pó fortificado com a mesma quantidade e tipo de sal de ferro da fórmula; e 3) controle – leite de vaca integral em pó não fortificado com ferro. Água e dieta foram oferecidas *ad libitum* com mensuração do volume consumido. Peso, hematócrito e hemoglobina foram mensurados no quinto e no 10º dia do experimento, quando foram analisados também comprimento, sangue oculto nas fezes e teor de ferro hepático.

Resultados: O grupo 1 ingeriu menor volume de dieta (450,5±26,50 mL) que os grupos 2 (658,8±53,73 mL) e controle (532,7±19,06 mL; $p < 0,001$). As concentrações de hemoglobina foram maiores ($p < 0,001$) no grupo 1 (12,1±1,13 g/dL) que nos grupos 2 (9,6±1,59 g/dL) e controle (6,2±0,97 g/dL). O teor de ferro hepático apresentou o mesmo comportamento da hemoglobina ($p < 0,001$). Não foi observada diferença de peso e comprimento nos três grupos ($p = 0,342$). Não foi detectado sangue oculto nas fezes de nenhum dos animais.

Conclusões: Apesar do menor volume ingerido, o grupo que recebeu fórmula apresentou maior absorção de ferro e concentração de hemoglobina que o grupo que recebeu leite de vaca integral fortificado. O crescimento foi semelhante nos três grupos.

J Pediatr (Rio J). 2009;85(5):449-454: Substitutos do leite humano, ferro na dieta, disponibilidade biológica, deficiência de ferro.

Abstract

Objective: To compare iron absorption from infant formula and iron-fortified cow's milk.

Methods: Twenty-four weanling Wistar rats were maintained in metabolic cages during the whole experiment (10 days). On the first day, the animals were divided into three similar groups according to their weight, length, hematocrit and hemoglobin levels: 1) infant formula; 2) powdered whole cow's milk fortified with iron in the same quantity and type as the formula; 3) control – powdered whole cow's milk not fortified with iron. Deionized water and diet were offered *ad libitum*, and the volume consumed was measured. Weight, hematocrit, and hemoglobin levels were measured on the fifth and 10th days when length, fecal occult blood, and hepatic iron levels were also analyzed.

Results: Group 1 consumed less diet (450.5±26.50 mL) than group 2 (658.8±53.73 mL) and control group (532.7±19.06 mL, $p < 0.001$). Hemoglobin levels were higher ($p < 0.001$) in group 1 (12.1±1.13 g/dL) than in group 2 (9.6±1.59 g/dL) and in control group (6.2±0.97 g/dL). Hepatic iron level showed the same pattern as hemoglobin ($p < 0.001$). There was no difference in weight and length between the three groups ($p = 0.342$). There was no fecal occult blood in the any of the animals.

Conclusions: Despite the lower volume consumed, the group that received formula presented higher iron absorption and hemoglobin levels than the group fed with fortified whole cow's milk. Growth was similar in the three groups.

J Pediatr (Rio J). 2009;85(5):449-454: Breast milk substitutes, dietary iron, biological availability, iron deficiency.

1. Mestre, Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Ciências Aplicadas à Pediatria, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP.
2. Doutora, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, UNIFESP, São Paulo, SP.
3. Professora adjunta, Departamento de Pediatria, UNIFESP, São Paulo, SP.
4. Estatística, Departamento de Medicina Preventiva, UNIFESP, São Paulo, SP.
5. Técnica, Setor de Termometabologia, Departamento de Fisiologia, UNIFESP, São Paulo, SP.
6. Professora adjunta, Departamento de Fisiologia, UNIFESP, São Paulo, SP.
7. Professor associado, livre-docente, Departamento de Pediatria, UNIFESP, São Paulo, SP.

Este estudo foi realizado na Disciplina de Gastroenterologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, e no Laboratório de Pesquisa, Departamento de Pediatria, UNIFESP, São Paulo, SP.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Conflito de interesse: neste experimento foram utilizadas fórmulas de partida e leite de vaca integral de um mesmo fabricante (Nestlé Brasil), que não participou da elaboração, execução ou financiamento do projeto.

Como citar este artigo: Costa ML, Freitas KC, Amancio OM, Paes AT, da Silva SM, Luz J, et al. Iron absorption from infant formula and iron-fortified cow's milk: experimental model in weanling rats. *J Pediatr (Rio J)*. 2009;85(5):449-454.

Artigo submetido em 04.05.09, aceito em 15.07.09.

doi:10.2223/JPED.1953

Introdução

Anemia ferropriva é a carência nutricional mais prevalente no mundo, e dentre os principais grupos de risco da doença estão crianças com idade inferior a 2 anos¹. Embora diversos fatores possam contribuir para o surgimento da anemia ferropriva no lactente, admite-se que ela resulte da combinação entre necessidades de ferro excepcionalmente elevadas, impostas pelo crescimento, e dietas com baixo teor de ferro, ou com ferro pouco biodisponível.

O aleitamento materno exclusivo durante os primeiros 6 meses de vida é a principal estratégia para o combate à deficiência de ferro nessa faixa etária¹. No entanto, no Brasil, em 2006, apenas 39,8% das crianças recebiam leite materno exclusivo até o sexto mês de vida². Para o grande contingente de lactentes vítimas da interrupção prematura do aleitamento materno, a utilização de fórmulas lácteas para lactentes fortificadas com ferro (fórmula infantil) constitui uma das alternativas mais adequadas para a sua nutrição³. Entretanto, em função de fatores culturais e socioeconômicos, o acesso e a disponibilidade dessas fórmulas são reduzidos, determinando que o leite de vaca integral seja o alimento substituto mais frequentemente utilizado⁴.

Apesar das evidências experimentais indicando que maiores quantidades de cálcio e proteína na dieta reduzem a absorção de ferro⁵⁻¹⁰, não existem estudos que avaliem seu efeito sobre os compartimentos corporais desse mineral durante o primeiro semestre da vida. Alguns métodos foram aplicados para avaliar a biodisponibilidade do ferro de alimentos utilizados por lactentes, principalmente técnicas *in vitro*^{5,10-14} e *in vivo* com adultos^{6,7,10,15} e com ratos com 14 ou 21 dias de vida^{11,16}. No entanto, em nenhum dos estudos da literatura foi comparada a absorção do ferro da fórmula infantil com a do leite de vaca integral fortificado, oferecido com frequência como única fonte de alimento para lactentes com menos de 6 meses não amamentados, considerando o leite de vaca integral como a opção de menor custo.

Assim, restrições éticas que limitam a análise dos efeitos negativos da administração de leite de vaca integral no primeiro semestre da vida do lactente e a falta de efetividade

das medidas para a prevenção da deficiência de ferro nessa população justificaram a realização deste projeto que tem como objetivo comparar a absorção de ferro em ratos recém-desmamados alimentados com fórmula de partida para lactentes em relação à absorção do mineral em animais alimentados com leite de vaca integral fortificado com a mesma quantidade e tipo de sal de ferro da fórmula infantil.

Métodos

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar, com 21 dias de vida (ao primeiro dia do desmame). O experimento foi realizado em duas etapas, cada uma com 12 animais. No primeiro dia do estudo, com o objetivo de formar três grupos semelhantes, os animais foram pesados e medidos, determinando-se, ainda, as concentrações de hematócrito e de hemoglobina. A pesagem foi realizada em balança eletrônica digital CG-Libror L-600 (CG Instrumentos Científicos Ltda., São Paulo, SP), com capacidade máxima de 600 g e sensibilidade de 0,1 g. O comprimento foi expresso em centímetros e considerou as medidas do corpo e da cauda. O sangue foi coletado na cauda do animal. O hematócrito e a hemoglobina foram determinados pelos métodos de Wintrobe¹⁷ e da cianometahemoglobina, respectivamente.

Após esses procedimentos, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais (Nalgene Metabolic Cages 650-0100, Tecniplast, Buguggiate, Itália) sob ciclo de luz de 12 horas e temperatura de 23±1 °C. Cada gaiola foi adaptada com dois bebedouros previamente tratados em ácido nítrico e enxaguados em água desionizada. Os animais alocados no grupo experimental 1 (n = 8) foram alimentados com fórmula de partida para lactentes; os do grupo experimental 2 (n = 8), com leite de vaca integral em pó fortificado com a mesma quantidade e tipo de sal de ferro da fórmula; e os do grupo controle (n = 8), com leite de vaca integral em pó não fortificado com ferro. Este último grupo foi constituído com a finalidade de validação do modelo experimental. Todas as dietas foram reconstituídas conforme o recomendado pelo fabricante, e a composição nutricional está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional das dietas oferecidas no experimento

Valor 100 mL da dieta reconstituída	Fórmula de partida	Leite de vaca fortificado	Leite de vaca não fortificado
Energia (kcal)	74,39	74,31	74,31
Carboidrato (g)	8,31	5,0	5,0
Lipídio (g)	4,01	4,58*	4,58*
Proteína (g)	1,36	3,25	3,25
Vitamina C (mg)	7,45	†	†
Cálcio (mg)	45,87	125,5	125,5
Sódio (mg)	17,2	43,5	43,5
Ferro (mg)	0,89	0,89‡	†

* Adição de 0,98 mL de óleo vegetal.

† Valor irrisório para o volume da dieta oferecida.

‡ Adição de 0,89 mg de ferro sob a forma de sulfato ferroso.

Durante todo o experimento (10 dias consecutivos), os animais receberam água desionizada no sistema MilliQ Plus (Millipore Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP) *ad libitum* e o mesmo volume de dieta láctea fluida (150 mL) fracionada em três administrações ao dia. Os volumes consumidos foram mensurados. Os bebedouros foram higienizados a cada troca.

No terceiro dia do experimento, foi coletada a diurese de 24 horas que, após ser mensurada, foi acondicionada em microtubos (Eppendorf do Brasil Ltda., São Paulo, SP) e congelada a -20 °C. Na urina, foram determinadas as concentrações de creatinina, sódio e ureia (Bayer ADVIA 1650, Bayer S.A., São Paulo, SP).

No quinto dia, foram mensurados o peso corporal, a hemoglobina e o hematócrito. Estes mesmos procedimentos foram realizados no 10º dia, quando foi mensurado também o comprimento. Pesquisa de sangue oculto nas fezes foi realizada em quatro animais de cada grupo com o emprego do kit Hemoplus (Newprov - Produtos para Laboratórios Ltda., Pinhais, PR) somente na segunda etapa do experimento.

Os animais, previamente anestesiados mediante inalação de isoflurano, foram sacrificados por exsanguinação pela veia cava. O sacrifício ocorreu entre as 6 e 10 horas da manhã¹⁸. O pH do conteúdo cecal foi mensurado diretamente no ceco pela penetração do eletrodo combinado DME-CF1 acoplado ao pHmetro DM-22 (Digimed, São Paulo, SP).

Os rins e o fígado de cada animal foram extraídos e pesados imediatamente (peso fresco) em balança analítica Mettler AB204 (Mettler Toledo Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP), com capacidade máxima de 200 g e sensibilidade de 0,1 mg. Após a pesagem, os rins foram descartados e os fígados armazenados em freezer a -20 °C para posterior dosagem do ferro hepático. Para tal, foi realizada secagem em estufa a 120 °C por 22 horas, definindo-se, então, o peso seco do fígado. Os fígados secos foram triturados, e a quantidade de ferro hepático foi determinada mediante o emprego de espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer 5100 (PerkinElmer do Brasil Ltda., São Paulo, SP).

Os animais foram eviscerados separando-se as carcaças constituídas por pelo, pele, gordura subcutânea, músculos, ossos, dentes e unhas. As carcaças foram pesadas em balança eletrônica digital para a obtenção do peso fresco e homogeneizadas e armazenadas em freezer para posterior determinação da água, gordura e proteína corporal. Amostra de 1,0 g do material homogeneizado foi utilizada para determinação da concentração de proteína total pelo método de Lowry¹⁹, e de 2,0 g, para determinação da gordura pelo método do clorofórmio-metanol²⁰. Estes dois testes foram realizados em duplicata. Após esses procedimentos, a carcaça fresca homogeneizada foi levada para a estufa FANEM 315 SE (FANEM Ltda., São Paulo, SP) a 60 °C por 1 semana, sendo então obtido o peso seco da carcaça, que foi corrigido de acordo com a quantidade da amostra previamente retirada. O percentual de água corporal foi determinado pela diferença entre o peso fresco e o peso seco da carcaça.

As variáveis paramétricas foram expressas em média e desvio padrão, e as variáveis não paramétricas, em mediana e percentis 25 e 75. Utilizaram-se os testes *t* de Student e

análise de variância ou de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos independentes conforme a distribuição das variáveis. Os testes de comparações múltiplas de Tukey ou Scheffe foram utilizados quando necessário. Os cálculos foram realizados mediante o emprego do programa de estatística SPSS versão 11.0 para Windows, fixando-se em 5,0% o nível para rejeição da hipótese de nulidade.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), CEP 0478/07, São Paulo (SP).

Resultados

Antes de iniciar a oferta das dietas experimentais, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos alimentados com fórmula de partida ($n = 7$), leite de vaca integral fortificado com ferro ($n = 8$), ou leite de vaca não fortificado ($n = 7$) quanto ao peso ($49,2 \pm 5,1$ versus $48,5 \pm 2,8$ versus $47,8 \pm 4,7$ g; $p = 0,820$), comprimento ($19,6 \pm 0,7$ versus $19,7 \pm 0,6$ versus $19,3 \pm 0,9$ cm; $p = 0,497$), hemoglobina ($8,8 \pm 0,5$ versus $9,1 \pm 0,8$ versus $9,0 \pm 0,5$ g/dL; $p = 0,648$) e hematócrito ($26,7 \pm 2,7$ versus $29,6 \pm 4,7$ versus $28,4 \pm 3,8$ %; $p = 0,369$), evidenciando uma similaridade entre os grupos que se manteve após a exclusão de dois animais que não completaram todo o período do estudo.

Durante todo o experimento, maiores volumes de dieta foram consumidos pelos grupos que receberam leite de vaca integral fortificado ($658,8 \pm 53,7$ mL) ou leite de vaca não fortificado ($532,7 \pm 19,1$ mL) quando comparados aos volumes do grupo alimentado com fórmula de partida ($450,5 \pm 26,5$ mL; $p < 0,001$). Como consequência, os grupos alimentados com leite de vaca integral fortificado ou não, em relação ao grupo que recebeu fórmula de partida, apresentaram maior ingestão de proteínas ($21,4 \pm 1,7$ versus $17,3 \pm 0,6$ versus $6,1 \pm 0,4$ g; $p < 0,001$), cálcio ($826,8 \pm 67,4$ versus $668,6 \pm 23,9$ versus $206,6 \pm 12,2$ mg; $p < 0,001$) e sódio ($286,6 \pm 23,4$ versus $231,7 \pm 8,3$ versus $77,5 \pm 4,6$ mg; $p < 0,001$). O grupo alimentado com leite de vaca integral fortificado apresentou também maior consumo de ferro ($5,9 \pm 0,5$ mg) quando comparado ao grupo alimentado com fórmula de partida ($4,0 \pm 0,2$ mg; $p < 0,001$). Não houve diferença no consumo de água entre os grupos que receberam fórmula de partida ($33,3 \pm 13,1$ mL), leite de vaca integral fortificado ($26,1 \pm 11,8$ mL), ou leite de vaca não fortificado ($40,9 \pm 16,47$ mL; $p = 0,188$).

Não foi observada diferença de peso e comprimento entre os grupos de estudo em nenhum momento do experimento. No quinto dia, os grupos que receberam fórmula de partida, leite de vaca integral fortificado, ou leite de vaca não fortificado apresentaram, respectivamente, média de peso igual a $50,7 \pm 4,8$, $53,8 \pm 4,8$ e $56,9 \pm 5,3$ g ($p = 0,094$). No 10º dia, esses valores foram $60,3 \pm 6,6$, $68,9 \pm 13,6$ e $64,1 \pm 11,5$ g ($p = 0,342$); enquanto as médias de comprimento dos grupos alimentados com fórmula de partida, leite de vaca integral fortificado, ou não fortificado foram, respectivamente, $22,5 \pm 1,1$, $23,4 \pm 2,0$ e $23,1 \pm 1,3$ cm ($p = 0,547$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa na eficiência alimentar. Também não houve diferença no percentual de

água ou dos teores corporais de gordura e proteína nos três grupos (Tabela 2).

O peso fresco dos rins foi similar nos três grupos: fórmula de partida (0,9±0,1 g), leite de vaca integral fortificado com ferro (0,9±0,1 g) e leite de vaca não fortificado (0,9±0,2 g; $p = 0,342$). Foi observado maior volume de diurese no grupo alimentado com leite de vaca integral fortificado em relação ao grupo alimentado com fórmula de partida. Não houve diferença no volume de líquido (água e fórmula, ou leite de vaca integral) consumido pelos três grupos no período de 24 horas correspondente à coleta da diurese. Os grupos alimentados com leite de vaca integral apresentaram maiores valores de sódio e ureia na urina do que o grupo alimentado com fórmula de partida. A creatinina urinária foi semelhante nos três grupos (Tabela 3).

A partir do quinto dia já foi observada diferença entre os grupos alimentados com fórmula de partida, leite de vaca integral fortificado, ou leite de vaca não fortificado nas concentrações da hemoglobina (13,0±0,49 *versus* 11,6±0,58 *versus* 7,7±0,57 g/dL; $p < 0,001$) e do hematócrito (38,3±3,93 *versus* 34,1±2,69 *versus* 22,3±1,48%; $p < 0,001$). No 10º dia, essas diferenças se mantiveram, correspondendo a 12,1±1,13, 9,6±1,59 e 6,2±0,97 g/dL,

os valores da hemoglobina ($p < 0,001$), e a 39,0±2,83, 30,7±3,28 e 18,7±2,98%, os valores do hematócrito ($p < 0,001$), respectivamente. A Figura 1 ilustra a evolução das concentrações médias (± desvios padrão) da hemoglobina no decorrer do experimento. Observou-se, também, diferença estatisticamente significativa quanto ao teor de ferro hepático, que foi maior no grupo que recebeu fórmula de partida (776,7±81,4 µg/g) em relação aos grupos que receberam leite de vaca integral fortificado (173,0±63,78 µg/g), ou leite de vaca não fortificado (99,7±13,99 µg/g; $p < 0,001$). Foi observada diferença do peso fresco do fígado entre os grupos que receberam fórmula de partida (2,6±0,3 g), leite de vaca integral fortificado (3,1±0,4 g), ou não fortificado (2,5±0,3 g; $p < 0,01$). No entanto, essa diferença deixou de existir quando se analisou o peso fresco do fígado corrigido para o peso do animal ($p = 0,115$): 0,04±0,01, 0,05±0,01 e 0,04±0,01 g, respectivamente.

O pH do conteúdo cecal não diferiu entre os grupos alimentados com fórmula de partida (5,5±0,5), leite de vaca integral fortificado (6,0±1,3), ou leite de vaca não fortificado (6,1±0,5; $p = 0,519$). Não houve presença de sangue oculto nas 12 amostras de fezes analisadas na segunda etapa do projeto.

Tabela 2 - Evolução ponderal, eficiência alimentar (relação entre o ganho de peso e a quantidade de dieta consumida) e composição corporal das carcaças ao fim do experimento

Variáveis	Fórmula de partida (n = 7)	Leite de vaca fortificado (n = 8)	Leite de vaca não fortificado (n = 7)	p*
Evolução ponderal (g)	11,1±5,55	20,4±13,48	16,4±9,99	0,247
Eficiência alimentar (g/g)	0,2±0,09	0,2±0,17	0,2±0,14	0,576
Proteína corporal (mg/g)	158,2±23,68	150,0±25,19	142,0±30,52	0,532
Gordura corporal (mg/g)	79,7±19,92	74,5±14,0	80,2±28,14	0,842
Água corporal (%)	72,2±1,24	71,3±1,35†	71,0±1,65	0,295

* Análise de variância.

† n = 7.

Tabela 3 - Volume de líquido consumido e de diurese em 24 horas e valores de creatinina, sódio e ureia na urina

Variáveis	Fórmula de partida (n = 6)	Leite de vaca fortificado (n = 6)	Leite de vaca não fortificado (n = 6)	p*
Consumo de líquido (mL)	30,3±4,34	38,5±8,79	37,6±8,50	0,151
Volume da diurese (mL)	17,6±3,26 ^a	23,4±2,57 ^b	20,3±3,39 ^{ab}	0,019
Sódio na urina (mmol/L)	12,3±2,34 ^a	26,8±4,44 ^b	24,3±4,76 ^b	< 0,001
Ureia na urina (mg/dL)	81,5 ^a (51,75-145,5)	864,0 ^b (786,5-1229,0)	1012,5 ^b (712,25-1239,75)	0,003 [†]
Creatinina na urina (mg/dL)	6,3±1,06	7,1±0,36	6,9±0,82	0,204

* Análise de variância.

† Kruskal-Wallis.

Variáveis com diferentes letras na mesma linha, $p < 0,05$.

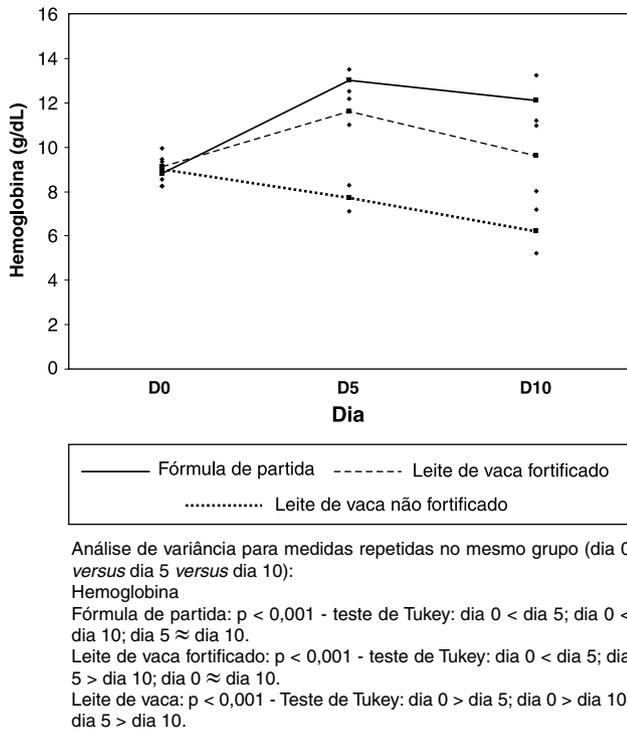


Figura 1 - Evolução das concentrações médias (\pm desvios padrão) de hemoglobina de acordo com o grupo de estudo

Discussão

O presente estudo mostrou que o consumo de ferro foi maior no grupo alimentado com leite de vaca integral fortificado quando comparado ao grupo que recebeu fórmula de partida e, evidentemente, quando comparado ao grupo alimentado com leite de vaca não fortificado. No entanto, após 10 dias de experimento, o grupo que recebeu fórmula de partida apresentou média de hemoglobina 20,6% superior à média daquele que recebeu leite de vaca integral fortificado. O grupo alimentado com leite de vaca não fortificado apresentou média de hemoglobina correspondente a 64,6% do valor encontrado no grupo que recebeu leite de vaca integral fortificado e 51,2% do valor encontrado no grupo que recebeu fórmula infantil. O teor de ferro hepático apresentou o mesmo comportamento que a hemoglobina. Desta maneira, confirmam-se as repercussões negativas do consumo de leite de vaca integral sobre a absorção do ferro em comparação com a fórmula de partida, observadas já no quinto dia do experimento, evidenciando depleção dos estoques corporais de ferro independente da fortificação desse mineral no leite.

Na literatura, dentre os artigos publicados que abordaram a absorção de ferro, poucos analisaram fórmulas infantis ou leites utilizados por lactentes. Esses estudos demonstraram que o cálcio⁵⁻⁷ e as proteínas do leite^{5,10,16} diminuem a biodisponibilidade do ferro, enquanto outros fatores dietéticos, como o ácido ascórbico, favorecem a sua absorção²¹.

O presente estudo é o primeiro que compara a absorção de ferro de uma fórmula infantil e a do leite de vaca integral

fortificado com ferro por um período contínuo suficiente para ocasionar mudanças significativas nos compartimentos corporais desse mineral. Esta estratégia reproduz o esquema alimentar de crianças no primeiro semestre de vida que suprem as suas necessidades nutricionais a partir de uma única fonte láctea, quando, por algum motivo, não recebem leite materno. Por motivos éticos, é praticamente impossível realizar este projeto com lactentes menores de 6 meses.

Ratos com 14 dias de vida foram utilizados em estudos anteriores como modelo para avaliação da biodisponibilidade de minerais em fórmulas infantis^{11,16}. No presente estudo, foram utilizados ratos com 21 dias de vida por apresentarem maior tolerância às dietas oferecidas quando comparados a ratos com 14 dias de vida ou a ratos adultos, conforme o observado em estudos pilotos realizados em nosso laboratório. Além disso, sabe-se que filhotes de ratos possuem elevado estoque de ferro corporal ao nascer, o qual decresce somente ao desmame, quando se observa aumento da absorção de ferro. Evidencia-se, assim, maior controle na regulação da absorção do ferro, em resposta a sua suplementação, em ratos de 20 dias de idade em relação àqueles com 10 dias de vida²².

Outro aspecto a ser enfatizado foi o uso exclusivo de fórmula de partida ou de leite de vaca integral como alimento oferecido durante 10 dias consecutivos. Em um estudo¹⁶ que avaliou os efeitos do processamento térmico sobre a biodisponibilidade do ferro em fórmulas infantis (desidratada ou esterilizada), ratos com 21 dias de vida foram alimentados com uma mistura a base de fórmula infantil líquida liofilizada e ração convencional. Não foi observado efeito negativo desta dieta sobre a absorção do ferro, o que ocorreu quando a mesma fórmula foi oferecida isoladamente aos animais com 14 dias de vida¹⁶. Isto possivelmente demonstre a influência da ração sobre a biodisponibilidade do ferro da dieta experimental, podendo este ser um viés no delineamento do estudo¹⁶ no qual não se utilizou dieta exclusivamente láctea.

Até o quinto dia do nosso experimento, os animais apresentaram ganho de peso semelhante ao apresentado por ratos da mesma idade alimentados com ração convencional. No 10º dia, o peso médio dos nossos animais correspondeu a cerca de 80,0% do valor esperado considerando esse mesmo parâmetro.

Apesar do maior consumo da dieta e da maior ingestão energética atingida pelos grupos que receberam leite de vaca integral quando comparados ao grupo que recebeu fórmula de partida, não foi observada diferença no ganho de peso entre os grupos. Também não foram observadas diferenças nos teores de água, gordura e proteína corporais. A eficiência alimentar foi semelhante nos três grupos de estudo.

A influência de altas cargas de eletrólitos e proteínas sobre o crescimento e a função renal foi analisada previamente na literatura^{23,24}. Em ratos, dietas com 12,0, 21,0 ou 50,0% de proteína mostraram aumento do peso dos rins somente no último grupo²⁴. Os percentuais de proteína das dietas fluidas do presente estudo (7,3 ou 17,5% nos grupos que receberam fórmula de partida ou leite de vaca integral, respectivamente), como era de se esperar, não ocasionaram diferença no peso dos rins.

Deve ser destacada, ainda, expressiva diferença na concentração urinária de sódio e ureia no terceiro dia do experimento, refletindo assim, após 3 dias do início do período de intervenção alimentar, as repercussões do maior consumo de sódio e proteína pelos grupos alimentados com o leite de vaca integral. A alta carga de soluto renal de um alimento requer consumo adequado de líquido para a manutenção da homeostase do organismo. Em nosso estudo, foi observado maior volume de diurese somente no grupo alimentado com leite de vaca integral fortificado e nenhuma diferença no consumo de líquido entre os três grupos.

Deve ser lembrado que lactentes podem apresentar sangue oculto nas fezes quando alimentados com leite de vaca integral²⁵. Esta análise não fazia parte do projeto inicial e foi incluída na segunda etapa em atenção à sugestão de pesquisadores que tiveram conhecimento dos resultados preliminares.

Em síntese, o presente estudo evidenciou menor absorção de ferro nos ratos alimentados com o leite de vaca integral fortificado com o mesmo tipo e teor de sal de ferro em relação aos alimentados com fórmula infantil. Demonstra-se, assim, ser de grande relevância a intervenção nutricional precoce em crianças não amamentadas que fazem uso do leite de vaca integral, evitando a deficiência do ferro e suas repercussões sistêmicas. Para finalizar, deve ser mencionado que o modelo experimental utilizado foi adequado para avaliar a interação entre os nutrientes das diferentes intervenções nutricionais e suas repercussões nos compartimentos corporais de ferro, sem comprometer contundentemente o crescimento dos animais alimentados com dieta fluida.

Referências

- World Health Organization, United Nations University, United Nations Children's Fund. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva: WHO; 2001. <http://www.who.int/reproductive-health/docs/anaemia.pdf>. Acesso: 31.08.2008
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. PNDS 2006. Pesquisa nacional de demografia e saúde da criança e da mulher. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/pnds/img/relatorio_final_pnds2006.pdf. Acesso: 31.08.2008.
- American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition: *The use of whole cow's milk in infancy*. *Pediatrics*. 1992;89:1105-9.
- Assis AM, Gaudenzi EN, Gomes G, Ribeiro RdeC, Szarfarc SC, Souza SB. *Hemoglobin concentration, breastfeeding and complementary feeding in the first year of life*. *Rev Saude Publica*. 2004;38:543-51.
- Nogueira CS, Colli C, Silverio Amâncio OM. Infant formula iron dialysability related to other nutrients. *Food Chem*. 2005;90:779-83.
- Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, Rossander-Hultén L. *Calcium: effect of different amounts on nonheme and heme-iron absorption in humans*. *Am J Clin Nutr*. 1991;53:112-9.
- Deehr MS, Dallal GE, Smith KT, Taulbee JD, Dawson-Hughes. *Effects of different calcium sources on iron absorption in postmenopausal women*. *Am J Clin Nutr*. 1990;51:95-9.
- Cook JD, Dassenko SA, Whittaker P. *Calcium supplementation: effect on iron absorption*. *Am J Clin Nutr*. 1991;53:106-11.
- Hallberg BL, Rossander-Hultén L, Brune M, Gleerup A. *Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium*. *Br J Nutr*. 1992;69:533-40.
- Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, Cook JD. *Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins*. *Am J Clin Nutr*. 1989; 49: 546-52.
- Sarriá B, Vaquero MP. *Zinc and iron bioavailability in a powder or in-bottle-sterilized infant formula estimated by in vitro and in suckling rats*. *J Nutr Biochem*. 2001;12:266-73.
- Drago SR, Valencia ME. *Influence of components of infant formulas on in vitro iron, zinc, and calcium availability*. *J Agric Food Chem*. 2004;52:3202-7.
- Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, Robberecht H, Van Dyck K, Van Cauwenbergh R, Deelstra H. *In vitro availability of calcium, iron, and zinc from first-age infant formulae and human milk*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001;32:54-8.
- Jovani M, Barbera R, Farre R, Martin de Aguilera E. *Calcium, iron, and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells*. *J Agric Food Chem*. 2001;49:3480-5.
- Hurrell RF, Davidsson L, Reddy M, Kastenmayer P. *A comparison of iron absorption in adults and infants consuming identical infant formulas*. *Br J Nutr*. 1998; 79:31-6.
- Sarriá B, Vaquero MP. *Iron bioavailability from powdered and in-bottle-sterilized infant formulas in suckling and weanling rats*. *Nutrition*. 2004;20:788-93.
- Wintrobe M, Mollin D, Hebert V, Blanc B, Finch C, Halberg L et al. *Anemias nutricionales*. Geneva: Organizacion Mundial de la Salud; 1968.
- Coudray C, Tressol JC, Gueux E, Rayssiguier Y. *Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats*. *Eur J Nutr*. 2003;42:91-8.
- Leshner AI, Litwin VA, Squibb RL. *A simple method for carcass analysis*. *Physiol Behav*. 1972;9:281-2.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. *J Biol Chem*. 1957;226:497-509.
- Cook JD, Reddy M. *Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet*. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:93-8.
- Leong WI, Bowlus CL, Tallkvist J, Lönnerdal B. *Iron supplementation during infancy—effects on expression of iron transporters, iron absorption, and iron utilization in rat pups*. *Am J Clin Nutr*. 2003;78:1203-11.
- Schmidt IM, Damgaard IN, Boisen KA, Mau C, Chellakooty M, Olgaard K, et al. *Increased kidney growth in formula-fed versus breast-fed healthy infants*. *Pediatr Nephrol*. 2004;19:1137-44.
- Jakobsson B, Celsi G, Lindblad BS, Aperia A. *Influence of different protein intake on renal growth in young rats*. *Acta Paediatr Scand*. 1987;76:293-9.
- Fernandes SM, de Morais MB, Amâncio OM. *Intestinal blood loss as an aggravating factor of iron deficiency in infants aged 9 to 12 months fed whole cow's milk*. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42:152-6.

Correspondência:

Mauro Batista de Morais
Rua Pedro de Toledo nº 441/443 - Vila Clementino
CEP 04039-031 - São Paulo, SP
Tel.: (11) 5579.5834
Fax: (11) 5579.5834
E-mail: mbmorais@osite.com.br