

Nutrire

REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO



24
DEZ/2002

JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF FOOD AND NUTRITION

NUTRIRE: REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO

Comissão Editorial / Editorial Committee

Célia Colli - *Editor Científico / Scientific editor*
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo

Elizabeth Wensel de Menezes - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Fernando Salvador Moreno - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Franco Maria Lajolo - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Hélio Vannucchi - Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo

Conselho Editorial / Editorial Board

Álvaro Oscar Campana - Faculdade de Medicina
de Botucatu da Universidade Estadual Júlio de
Mesquita Filho

Anita Sachs - Universidade Federal de São Paulo /
Escola Paulista de Medicina

Dirce Maria Sigulem – Universidade Federal de São
Paulo / Escola Paulista de Medicina

Elizabeth de Souza Nascimento – Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de São
Paulo

Elizabeth Aparecida Ferraz Silva Torres – Faculdade de
Saúde Pública da Universidade de São Paulo

Felix Reyes – Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade de Campinas

José Augusto de Aguiar Taddei – Universidade Federal
de São Paulo / Escola Paulista de Medicina

José Alfredo Gomes Áreas – Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo

Júlio César Moriguti – Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Júlio Tirapegui – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo

Lilian Cuppari – Universidade Federal de São Paulo
/ Escola Paulista de Medicina

Luis Antonio Gioielli – Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Maria de Fátima N. Marucci – Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo

Maria de Lourdes Pires Bianchi – Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo

Maria José Roncada – São Paulo, SP

Maria Lúcia Rosa Stefanini – Instituto de Saúde da
Secretaria da Saúde de São Paulo

Maria Sylvia de Souza Vitale – Universidade Federal
de São Paulo / Escola Paulista de Medicina

Olga Maria Silverio Amancio - Universidade Federal
de São Paulo / Escola Paulista de Medicina

Rebeca C. de Angelis – São Paulo, SP

Regina Mara Fisberg – Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo

Rejane Andréa Ramalho – Universidade Federal do
Rio de Janeiro

Rui Cury – Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de São Paulo

Semiramis Martins Álvares Domene – Pontifícia
Universidade Católica de Campinas

Silvia Berlanga de Moraes Barros – Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de São
Paulo

Sonia Tucunduva Philippi – Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo

Sophia Cornbluth Szarfac – Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo

Tasso Moraes e Barros – Universidade Federal de
Minas Gerais

Thais Borges Cezar – Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual Júlio de
Mesquita Filho

Tullia M. C. C. Filisetti – Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Normalização e indexação / Normalization and indexing

Bibl. M. Della Fuente

The SBAN reserves all rights, including translation rights, in all signatory countries of the Panamerican Copyright Convention and of the International Copyright Convention. The SBAN will not be responsible for concepts expressed in signed articles, and do not accept payed articles. The views, political views and opinions expressed here by authors or by advertisers do not always reflect the policies or position of the Nutrire. No articles published here may be reproduced or distributed for any purpose whatsoever without the express written permission. Reproduction of abstracts is allowed as long as the right source is quoted.

A Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição reserva-se todos os direitos, inclusive os de tradução, em todos os países signatários da Convenção Panamericana e da Convenção Internacional sobre os direitos autorais. Não nos responsabilizamos por conceitos emitidos em matéria assinada e também não aceitamos matéria paga em nosso espaço editorial. Os pontos de vista, as visões políticas e as opiniões aqui emitidas, tanto pelos autores como pelos anunciantes, nem sempre refletem a orientação desta revista.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO-SBAN

Nutrire

REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO
JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF FOOD AND NUTRITION

ISSN - 1519-8928

Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v.24, p.1-162, dez.2002

**São Paulo, SP-Brasil
2003**

© Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN
Publicação semestral /Biannual publication
Tiragem/Print-run: 1000
Impresso no Brasil/Printed in Brazil
Capa: Ademar Assaoka
Revisão e diagramação: Informed

Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição=Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition, São Paulo, SP. v.1, (1990) - São Paulo, SP: SBAN, 2000 -

Semestral.

Resumos em inglês e espanhol.

Continuação dos Cadernos de Nutrição, a partir do v. 19/20 (2000).

1. Alimentos e alimentação – Periódicos. 2. Nutrição – Periódicos. I. Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN

ISSN1519-8928

CDD 612.305
664.005

É permitida a reprodução de resumos com a devida citação da fonte / Reproduction of abstracts is allowed as long as the right source is quoted.

EDITORIAL

O Projeto Fome Zero, proposto por uma organização não governamental, é tema, no momento atual, de grandes discussões em toda a sociedade. Ele tem como metas principais garantir a segurança alimentar e nutricional da população brasileira, combatendo a fome e as causas estruturais que geram a exclusão e a desigualdade social.

O Programa Fome Zero tem três grandes enfoques: a ampliação da demanda efetiva de alimentos, o barateamento de seu preço e, por último, a implantação de programas assistenciais emergenciais para atender à população marginalizada.

Não estão ainda definidos os mecanismos operacionais destinados tanto a atender às propostas de intervenção, como a priorizar as ações mais urgentes e, principalmente, aqueles necessários a manter a sociedade civil envolvida nessa cruzada de disponibilizar alimentação saudável para todos.

Congregando profissionais e pesquisadores brasileiros da área de Alimentação e Nutrição, a SBAN muito tem a contribuir para o sucesso do Programa Fome Zero. São inúmeras as pesquisas desenvolvidas no país visando o diagnóstico, a identificação dos fatores determinantes e a avaliação de intervenções para o controle e/ou a correção de problemas nutricionais. Não falta, entre nós, conhecimento sobre o papel ímpar da educação alimentar na mudança de práticas alimentares inadequadas, bem como na formação de práticas alimentares saudáveis.

Assim, cumprindo nosso papel, conclamamos a todos a participarem do Projeto Fome Zero, oferecendo ao Programa a sua experiência profissional.

Sophia Szarfarc
Conselho Editorial

Célia Colli
Editora Científica

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos Originais/Original Articles

- 7** Caracterización química y sensorial de tres téis digestivos
Chemical and sensorial characterization of three digestive teas
Emma WITTIG DE PENNA, Marianela NORAMBUENA L., Rosa NEGRETE C.,
Regina FUENZALIDA M.
- 21** Fatores que influenciam o consumo de leite por crianças de 1a.série do Ensino Fundamental do município de Santa Maria, RS.
Factors that effect milk intake by children from the first grade of elementary school from Santa Maria, RS.
Maria Cristina HECK, Simone ROSSATO, Joice Sifuentes dos SANTOS, Stanislaw BOGUSZ JUNIOR, Ijoni COSTABEBER, Tatiana EMANUELLI
- 33** Dietas hiperlipídicas e frequência alimentar: efeitos sobre as reservas lipídicas em ratos
Fat diets and meal feeding: effects on body fat in rats
Rachel Pamfílio FRANCISCHI, Luciana Oquendo PEREIRA, Patricia Lopes CAMPOS, Letícia Aiko SAWADA, André dos Santos COSTA, Hamilton Augusto Silva ROSCHEL, Marcelo LUIS MARQUEZI, Fernanda Baeza SCAGLIUSI, Perla Menezes PEREIRA, Antonio Herbert LANCHÁ JÚNIOR
- 51** Hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado como fonte de oligopeptídeos para formulações dietéticas
Enzymatic hydrolysates from skimmed powder milke as source of oligopeptides for dietary formulations
Daniella Cristine Fialho LOPES, Viviane Dias Medeiros da SILVA, Harriman Aley MORAIS, Marcelo Matos SANTORO, Amintas Fabiano de Souza FIGUEIREDO, Marialice Pinto Coelho SILVESTRE
- 71** Estimativa do consumo de EDTA em escolares
Assessment of EDTA intake in schoolchildren
Regina Mara FISBERG, Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva TORRES, Juliana Massami MORIMOTO, Mauro FISBERG, Héctor ARRAYA L., Gloria VERA A., Eduardo CASTAÑO TOSTADO, Miriam Aracely ARRAYA LOYOLA, Olga P. GARCIA, Nelson ALMEIDA

Artigos de Revisão/Revision Articles

- 85** Importância do ferro em nutrição humana
Importance of iron in human nutrition
Romilda Maria de Arruda GERMANO, Solange Guidolin CANNIATTI-BRAZACA
- 105** Ácidos graxos: uma revisão
Fatty acids: a review
Nara Xavier MOREIRA, Rui CURI, Jorge MANCINI FILHO
- 125** Reações adversas a alimentos e imunidade humoral: subclasses de IgG a antígenos alimentares
Adverse reactions to food and humoral immunity: IgG subclasses to dietary antigens
Camila Maria ZANIN, Julio Sérgio MARCHINI, Ivan Fiori de CARVALHO
- 135** As múltiplas funções das lectinas vegetais
The multiple functions of plant lectins
Karen Lentini POVINELLI, Flávio FINARDI FILHO

Caracterización química y sensorial de tres téis digestivos

Chemical and sensorial characterization of three digestive teas

ABSTRACT

WITTIG DE PENNA, E.; NORAMBUENA L.,M.; NEGRETE C.,R.; FUENZALIDA M.,R. Chemical and sensorial characterization of three digestive teas. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP. v.24, p.7-20, dez., 2002.

The infusions and extracts of three digestive teas - chamomile (Matricaria chamomilla), mint (Mentha piperita) and boldo (Peumus boldus Molina) - were characterized by quantitative descriptive sensory analysis, and by thin layer chromatography. The active principles were related to sensorial perceptions to explain their election and differentiation. In the sensory characterization of each one of the products by a trained panel, a list of descriptors was developed that later on were quantified in 10 cm semi-structured scales. The answers about the 3 products were analyzed by an ANOVA with 3 sources of variation: samples, judges and repetitions, followed by the Duncan multiple range test (Statgraphics 5.0) in order to verify if the consumer could differentiate the infusions by means of their attributes. The panel differentiated them significantly ($p \leq 0,05$). Chromatographic analyses identified the active principles and secondary metabolites of the infusions and extracts: boldina for boldo, menthol for mint, chamazuleno and bisabolol for chamomile were identified and related to the descriptors generated by the panel.

Keywords: digestive teas, herbal tea, quality attributes, active principles

EMMA WITTIG DE PENNA ¹
MARIANELA
NORAMBUENA L. ²,
ROSA NEGRETE C. ³,
REGINA
FUENZALIDA M. ⁴

¹ Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas, Universidad de Chile

² Ingeniero en Alimentos, Universidad de Chile

³ Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

⁴ Pontificia Universidad Católica de Chile. Instituto de Investigaciones y Ensayos Farmacológicos. Universidad de Chile.

Endereço para correspondência:

Emma Wittig de Penna
Universidad de Chile
Casilla 233,
Santiago. Chile.
ewitting@uchile.cl

AGRADECIMIENTOS

Vayan nuestros más sinceros agradecimientos al grupo de panelistas, por su entusiasmo y valiosa cooperación. También se agradece a Laboratorios Knopp y Laboratorios Hochstetter por su colaboración al proporcionar los productos utilizados en este estudio. Por último, se agradece a Dn. Manuel Romero, experto calificado de la Empresa Te Fix, por su cooperación y sugerencias en la evaluación sensorial de los infusos.

RESUMEN

Se estudiaron tres tés digestivos: de manzanilla (Matricaria chamomilla), de menta (Mentha piperita) y de boldo (Peumus boldus Molina) por análisis sensorial descriptivo cuantitativo y por cromatografía en capa fina de la infusión y el extracto. Los principios activos se relacionaron con las percepciones sensoriales para explicar su elección y diferenciación. Para la caracterización sensorial de cada uno de los productos por un panel entrenado se desarrolló una lista de descriptores que posteriormente se cuantificaron en escala semiestructurada de intensidad, de 10 cm. Para probar la diferenciación de las infusiones se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de 3 variables: muestra, jueces y repeticiones y el teste de Duncan sobre el conjunto de descriptores de los 3 productos (Statgraphics 5.0). El panel caracterizó en forma muy diferenciada ($p \leq 0,05$) los 3 productos. Los análisis cromatográficos identificaron los principales constituyentes activos y metabolitos secundarios, en las infusiones y los extractos: boldina para el boldo, mentol para la menta, chamazuleno y bisabolol para la manzanilla, los cuales se relacionaron con los descriptores generados por el panel.

Palabras-clave: té digestivo, términos descriptivos, atributos de calidad, principios activos

RESUMO

Foi feita a caracterização de tres chás digestivos: camomila (Matricaria chamomilla), hortelã (Mentha piperita) e boldo (Peumus boldus Molina) pela análise sensorial descritiva e pela cromatografia em camada delgada de infusos e extratos. Os princípios ativos se relacionaram com as percepções sensoriais para explicar sua escolha e diferenciação. Na caracterização sensorial de cada um dos produtos, por um painel treinado, desenvolveu-se uma lista de descritores que foram posteriormente quantificados em escalas semi-estruturadas de intensidade, de 10 cm. Para verificar a diferenciação dos infusos foi feita uma análise de variância (ANOVA) considerando tres variáveis: amostras, juizes e repetições e o teste de Duncan a fim de verificar se o consumidor pode diferenciar os infusos pelos seus atributos (Statgraphics 5.0). O painel caracterizou os tres produtos de maneira muito diferenciada ($p \leq 0,05$) Pelas análises cromatográficas foram identificados os principais constituintes ativos dos infusos e extratos e seus metabólitos secundários: boldina para o boldo, mentol para a hortelã, e camazuleno e bisabolol para a camomila, os quais se relacionaram com os descritores gerados pelo painel.

Palavras-chave: chás digestivos, atributos de qualidade; princípios ativos

INTRODUCCIÓN

Una tradición popular chilena es beber tés digestivos luego de las comidas principales, almuerzo y cena (“agüitas”, “agüitas de hierbas”, “montecitos”, “tecitos de hierbas”). Este hecho junto con la creciente revalorización de los productos naturales hace que el uso de plantas medicinales destinadas a complementar la alimentación sea cada vez más importante (KATZER, 1998).

Con el fin de aportar antecedentes que expliquen este hábito, y comprobar si realmente estas bebidas proporcionan algún bienestar derivado de la presencia de metabolitos secundarios, se eligieron las tres especies de plantas medicinales más utilizadas como tés digestivos: manzanilla (*Matricaria chamomilla*), menta negra (*Menthae piperitae*) y boldo (*Peumus boldus*) (PAMPLONA, 1996; NORAMBUENA, 1999; INIA, 2001).

La hipótesis de trabajo fue: si el consumidor, decide ingerir alguna “agüita” después de almorzar o cenar, es porque realmente le proporciona algún bienestar. Este efecto, debería ser la consecuencia de la existencia de metabolitos secundarios en estos infusos vegetales.

H₀: el consumidor no diferencia los atributos de los tres tés digestivos; es decir, le da lo mismo ingerir cualquiera de ellos.

H₁: el consumidor diferencia los atributos de los tres tés digestivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES DE LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICA:

Placa de cromatografía en capa fina (c.c.f.): gel de sílice 60, área de superficie específica: 500 cm²/g, volumen de poro 0.75 cm³, diámetro de poro:60 Å.

Extractos e infusos: manzanilla y menta: extracto en diclorometano al 15 %. Infuso en diclorometano al 10 %. Boldo: extracto al 22,5 % en diclorometano. Infuso al 10 % en diclorometano.

Sistemas de desarrollo: mezcla benceno:cloroformo (75:25) para manzanilla; diclorometano para menta; mezcla butanol: ácido acético: agua (4:1:5) para boldo.

Patrones utilizados: mentol y boldina (Merck)

Reactivos reveladores de los constituyentes activos

Anisaldehído - ác. sulfúrico: en el espectro visible, los componentes de la esencia aparecen coloreados azul fuerte, verde, rojo y café. Algunos compuestos también tienen fluorescencia al UV-365nm (1).

Reactivo de Dragendorff: a la luz visible aparecen zonas cafés o anaranjadas inmediatamente después de pulverizar con el reactivo. Los colores no son estables (WAGNER *et al.*, 1984).

MATERIALES DE LA CARACTERIZACIÓN SENSORIAL

Productos: manzanilla y menta infusión 0.625 %. Boldo: infusión 0.75 %

ESTÁNDARES PARA EL ENTRENAMIENTO

Color: infusiones de los mismos vegetales en distinta concentración

Transparencia: infusos con 0,0625% de almidón de maíz (maicena DROPA)

Aroma frutal: solución 1,7% de aroma Blackberry (H&R)

Aroma floral: mezcla de flores aromáticas secas

Aroma a yerbas digestivas: mezcla en pesos iguales de yerbas secas de manzanilla, boldo, menta, rosa mosqueta y cedrón

Aroma/Sabor alcohólico: vino Cabernet Sauvignon tinto diluido al 10 y 25%

Aroma/sabor a menta: cristales de mentol (Merck)

Gusto dulce: solución de sacarosa al 3%

Gusto amargo: solución de cafeína al 0,06 %

MÉTODOS

Entrenamiento del panel sensorial

Los panelistas se seleccionaron de acuerdo a sus habilidades para discriminar diferencias tanto en las propiedades sensoriales de téis digestivos de distinta calidad y procedencia como para evaluar productos en que se realizaron modificaciones simulando posibles cambios de los mismos. El panel recibió un entrenamiento bastante completo, empleando normas internacionales (3). Se realizaron 3 sesiones con los estándares de cada descriptor representando los extremos de la escala. El panel evaluó en panel abierto para facilitar la discusión y obtener el consenso al definir y seleccionar los descriptores definitivos para cada producto.

Análisis descriptivo cuantitativo: los jueces identificaron y cuantificaron los diferentes descriptores de los extractos e infusos, usando escalas lineales no estructuradas de 10 cm ancladas en los extremos. Se realizaron seis sesiones para generar la terminología para la descripción de cada uno de los productos comerciales. En una sesión adicional se estableció por consenso los descriptores más representativos (CIVILLE *et al.*, 1991). A continuación se cuantificaron los descriptores seleccionados utilizando una escala lineal de 10 cm (intensidad desde ausente a muy intenso) para cuantificar las respuestas de los panelistas de acuerdo a su percepción (ISO 4121, 1987). La evaluación de cada producto se realizó en triplicado, en 3 diferentes sesiones para cada producto. Se trabajó en cabinas aisladas de estímulos externos, iluminadas con luz similar a la luz día, a temperatura ambiente de 20-22°C y 55-60% de humedad relativa, como medio de neutralización se usó agua potable desmineralizada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados por ANOVA y Test de Duncan (Statgraphics 5.0)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Manzanilla: mediante la cromatografía en capa fina se identificaron los componentes activos: chamazuleno y bisabolol, además de otros componentes secundarios que se detallan en la Tabla 1. Se observa la presencia de cantidades significativas de chamazuleno, el cual no se encuentra inicialmente en la planta, ya que es derivado de un proazuleno incoloro hidrosoluble, la matricina, que a temperaturas ≥ 100 ° C forma el ácido chamazulénico que por descarboxilación se transforma en chamazuleno. Por esta razón, la cromatografía del extracto difiere de la del infuso, puesto que la matricina se ha transformado en chamazuleno.

TABLA 1 Identificación de compuestos de la manzanilla

Compuesto	Color	Extracto	Infuso	Rf
Farneseno	Azul-violeta	•	•	0.91
Chamazuleno	Rojo-violeta	•	•	0.88
Cis/trans en- in- dicioéter	Café	•	•	0.59
Bisabolol	Azul-violeta	•	•	0.31
Herniarina (fluorescencia)	Azul	•	•	
Bisabololóxido A y B	Amarillo	•	•	0.17
Matricina	Azul	•		0.09

• Indica la presencia del compuesto. (WAGNER, 1984)

TABLA 2 Descriptores para infuso de manzanilla

PARÁMETRO	DESCRIPTOR
Color	Amarillo
Apariencia	Transparente
	Floral
Aroma	Dulzón
	Yerba seca
	Amargo
Gusto	Dulce
	Floral
Gusto residual	Amargo

El perfil descriptivo cuantitativo para el infuso de manzanilla se detalla en la Tabla 2 y en el gráfico polar (Figura 1). Se observa que las mayores intensidades percibidas fueron para los descriptores: “transparencia”, “aroma floral”, “aroma dulzón” y “sabor floral”, debido a que el té está constituido por los capítulos florales del vegetal.

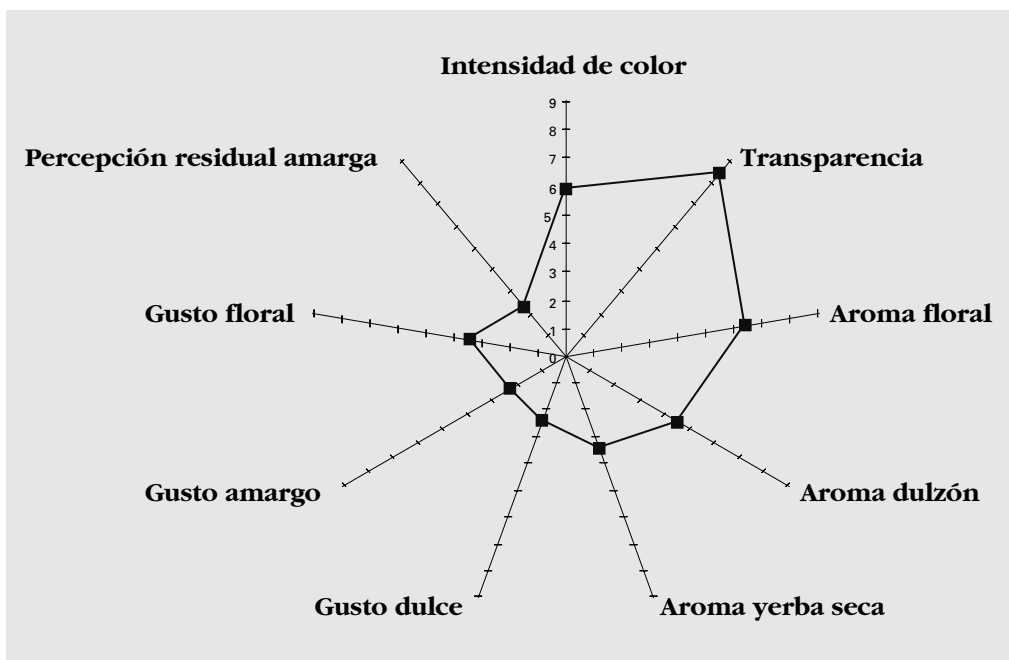


Figura 1 Representación gráfica del perfil descriptivo cuantitativo para el infuso de manzanilla

Menta negra: la cromatografía realizada tanto con el extracto de menta negra como con el infuso revelaron la presencia de mentol y metabolitos secundarios (Tabla 3). El cromatograma del infuso, sólo revela la presencia de mentol ya que los demás constituyentes sólo se encontraron en el extracto. Esto puede deberse a una baja concentración en el infuso, debido a que la temperatura del agua (98°C) favorecería la volatilización de los componentes de la esencia contenida en los pelos glandulares del material vegetal y que el consumidor percibe como aroma. En la Tabla 4 se observa el perfil descriptivo de este infuso. En el Figura 4 se observa que las mayores intensidades percibidas fueron para los descriptores “aroma refrescante”, “frescura” (sabor refrescante) y “residual fresco”, respectivamente, que se deben a la presencia de mentol.

Boldo: los cromatogramas tanto del extracto como del infuso (Figura 3), revelaron la presencia de seis alcaloides (Tabla 5), identificándose sólo la boldina, que es el alcaloide de reconocida mayor actividad fisiológica. No hay diferencias entre el extracto y el infuso, lo que indicaría que en este último estarían presentes todos los alcaloides de la hoja de boldo.

TABLA 3 Identificación de compuestos de la menta

Terpenos	Color	Extracto	Infuso	Rf
Mentofurano	Anaranjado	•	•	0.86
Mentilacetato	Azul	•		0.70
Mentona	Amarillo verdoso	•		0.52
Cineol	Azul-violáceo	•		0.44
Mentol	Azul	•	•	0.32

• Indica que el compuesto está presente. (STAHL *et al.*, 1981)

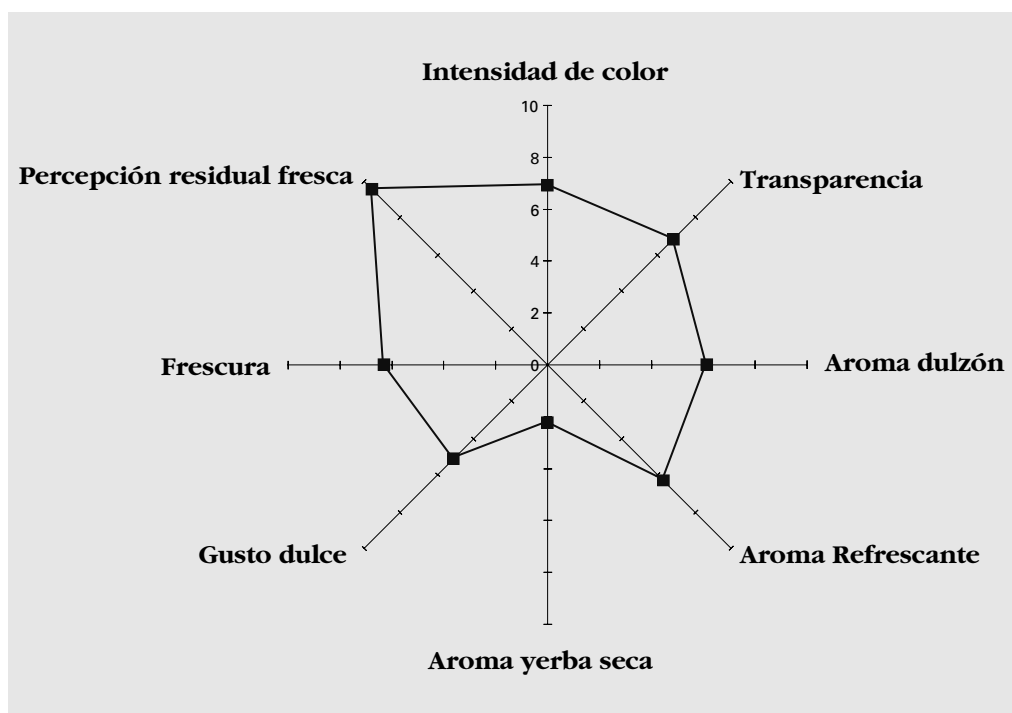


Figura 2 Representación gráfica del perfil descriptivo cuantitativo para el infuso de menta.

El perfil descriptivo desarrollado para el infuso de boldo se encuentra en la Tabla 6. En el Figura 3, se observan las mayores intensidades percibidas: “transparencia”, “aroma a yerba seca”, “aroma áspero”, “gusto astringente” (debido a la presencia de taninos) y “residual seco” (sequedad) debido a la presencia de los alcaloides.

Análisis estadístico: el análisis estadístico de los resultados se realizó sobre el conjunto de los tres productos con el fin de verificar la validez de la hipótesis que el consumidor no diferencia los diferentes téis y los consume indiferentemente. En la Tabla 7, se observa que los valores F de las muestras son altamente significativos, lo que per-

mite rechazar H_0 y aceptar la hipótesis alternativa que plantea que los consumidores diferencian los atributos de los tres tés digestivos. Al obtener valores F significativos se continuo con el test de Duncan, cuyos resultados se encuentran en la Tabla 8. Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre los 3 productos para todos los descriptores., lo que confirma la hipótesis alternativa.

TABLA 4 Descriptores para infuso de menta

PARÁMETRO	DESCRIPTOR
Apariencia	Transparente
Color	Amarillo pardo
Aroma	Refrescante
	Dulzón
	Yerba seca
	Fresco
Gusto	Dulce
Percepción residual	Frescura

TABLA 5 Identificación de compuestos del boldo

Alcaloide	Color	Extracto	Infuso	Rf
n.i.	Anaranjado	•	•	0.14
n.i.	Café	•	•	0.18
n.i.	Café	•	•	0.23
Boldina	Café	•	•	0.31
n.i.	Anaranjado	•	•	0.36
n.i.	Anaranjado	•	•	0.43

n.i. = no identificado.

• Indica que el alcaloide está presente. (WAGNER, 1984)

CONCLUSIONES

Mediante cromatografía en capa fina se identificaron los principales constituyentes activos: chamazuleno y bisabolol para manzanilla, mentol para menta y boldina para boldo. Además, se identificaron algunos metabolitos secundarios.

Se confirmó que los principios activos del extracto se mantienen en la infusión de cada uno de los tés.

El panel caracterizó en forma muy diferenciada ($p \leq 0.050$) los tres infusos, en todos los descriptores de calidad sensorial generados. De este modo, el té de boldo se caracteriza por presentar atributos relacionados con la percepción astringente provocada por la presencia de taninos. De los tres productos analizados, resultó ser el menos aromático (floral y dulzón), caracterizado como “a yerba seca” y con mayor gusto residual astringente.

El té de manzanilla fue caracterizado por descriptores relacionados con aroma y gusto.

El té de menta se caracterizó por presentar atributos relacionados con la percepción de frescura debido al alto contenido de mentol. El gusto residual, caracterizado por la sensación de frescura, es más intenso que las percepciones del aroma y del gusto. Además, presentó percepciones más intensas de aroma y un gusto dulzón.

Los perfiles descriptivos establecidos para cada uno de los téis digestivos son los siguientes:

manzanilla: aspecto transparente; color amarillo; aroma floral, dulzón, a yerba seca; gusto dulce, amargo, floral; gusto residual amargo

boldo: aspecto transparente; color anaranjado rojizo; aroma áspero, a yerba seca; gusto amargo, áspero; gusto residual amargo, seco, metálico

menta negra: aspecto transparente: color amarillo pardo; aroma refrescante, dulzón, yerba seca; gusto fresco, dulce; gusto residual fresco

En consecuencia, el consumo de estos tres téis digestivos se puede considerar que es un hábito resultante de los efectos fisiológicos que el consumidor obtiene al ingerir los infusos, los que elige de acuerdo a sus expectativas sensoriales.

TABLA 6 Descriptores para el infuso de boldo

PARÁMETRO	DESCRIPTOR
Apariencia	Transparente
Color	Anaranjado rojizo
Aroma	Áspero Yerba seca
Gusto	Áspero Amargo Seco
Percepción residual	Metálico Amargo

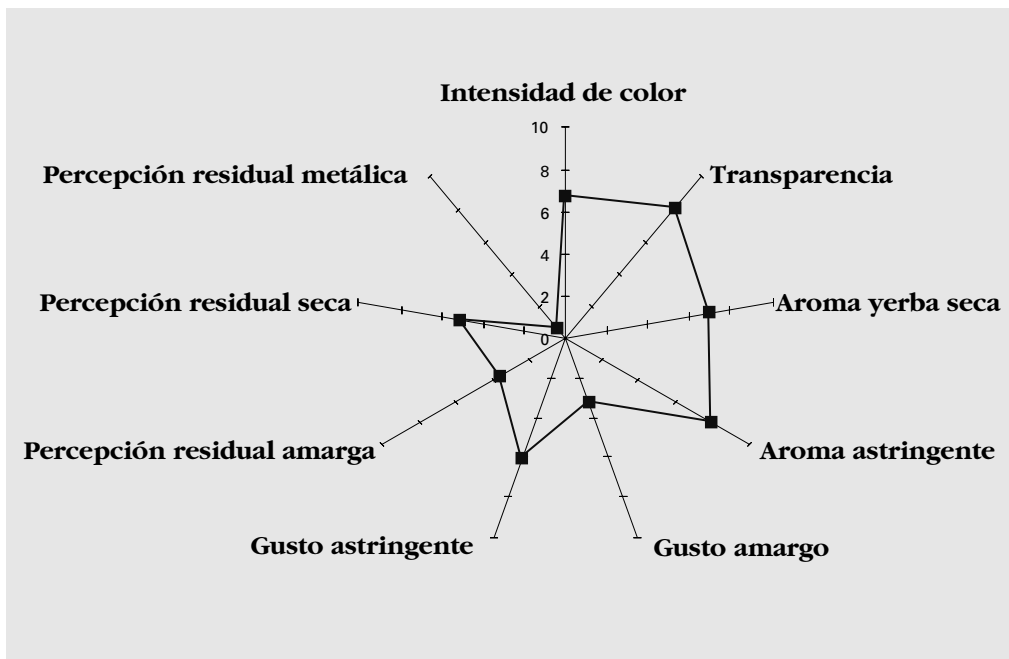


Figura 3 Representación gráfica del perfil descriptivo cuantitativo para el infuso de boldo.

AGRADECIMIENTOS

Vayan nuestros más sinceros agradecimientos al grupo de panelistas, por su entusiasmo y valiosa cooperación. También se agradece a Laboratorios Knopp y Laboratorios Hochstetter por su colaboración al proporcionar los productos utilizados en este estudio. Por último, se agradece a Dn. Manuel Romero, experto calificado de la Empresa Te Fix, por su cooperación y sugerencias en la evaluación sensorial de los infusos.

TABLA 7 Tabla de valores F del análisis de varianza

DESCRIPTOR		Media		Valor F	Significación
Intensidad color	manzanilla	5.8411	Muestras	153.537	.0000
	boldo	6.7667	Jueces	.795	.6093
	menta	6.7744	Repeticiones	.047	.9544
Transparencia	manzanilla	9.4325	Muestras	400.440	.0000
	boldo	9.0873	Jueces	.896	.4129
	menta	6.9981	Repeticiones	1.674	.1207
Aroma floral	manzanilla	6.4200	Muestras	8731.522	.0000
	boldo	1.5711	Jueces	1.479	.1811
	menta	3.4044	Repeticiones	.444	.6436
Aroma dulzón	manzanilla	4.7789	Muestras	3255.780	.0000
	boldo	1.2889	Jueces	1.172	.3288
	menta	6.3522	Repeticiones	.042	.9590
Aroma yerba seca	manzanilla	3.2133	Muestras	5206.348	.0000
	boldo	6.7222	Jueces	1.261	.2783
	menta	2.4244	Repeticiones	.645	.5277
Aroma astringente	manzanilla	4.9178	Muestras	10675.180	.0000
	boldo	7.9911	Jueces	.633	.1318
	menta	2.2478	Repeticiones	.230	.7951
Aroma refrescante	manzanilla	1.9400	Muestras	7420.364	.0000
	boldo	0.8144	Jueces	1.410	.2085
	menta	6.3400	Repeticiones	.076	.9273
Gusto dulce	manzanilla	2.4511	Muestras	7465.443	.0000
	boldo	0.6756	Jueces	1.545	.1581
	menta	5.1433	Repeticiones	.290	.7490
Gusto amargo	manzanilla	2.1800	Muestras	8657.270	.0000
	boldo	3.2111	Jueces	1.660	.1243
	menta	0.7678	Repeticiones	1.977	.1464
Gusto floral	manzanilla	3.3289	Muestras	1701.702	.0000
	boldo	0.6967	Jueces	.355	.9404
	menta	2.3322	Repeticiones	.631	.5354
Gusto astringente	manzanilla	1.1844	Muestras	9661.702	.0000
	boldo	6.1456	Jueces	1.259	.2796
	menta	0.4556	Repeticiones	.541	.5849
Gustofresco	manzanilla	0.8933	Muestras	40828.590	.0000
	boldo	0.4533	Jueces	1.711	.1115
	menta	6.3133	Repeticiones	2.434	.0953
Residual amargo	manzanilla	2.3522	Muestras	1125.601	.0000
	boldo	3.5889	Jueces	.961	.4738
	menta	0.9711	Repeticiones	2.058	.1356
Residual seco	manzanilla	2.9467	Muestras	3022.273	.0000
	boldo	5.2222	Jueces	1.376	.2228
	menta	0.6811	Repeticiones	.180	.8360
Residual fresco	manzanilla	0.9444	Muestras	45980.571	.0000
	boldo	0.4333	Jueces	.985	.4551
	menta	9.6378	Repeticiones	1.044	.3575
Residual metálico	manzanilla	0.3289	Muestras	261.056	.0000
	boldo	0.5367	Jueces	1.423	.2030
	menta	0.2411	Repeticiones	.438	.6473

TABLA 8 Comparaciones múltiples de los valores promedios para los descriptores sensoriales. Test de Duncan ($p \leq 0,05$)

Descriptor	Muestra	Promedio
Intensidad color	manzanilla	5.8407 ^a
	boldo	6.7593 ^b
	menta	6.7741 ^b
Transparencia	manzanilla	8.4074 ^a
	boldo	7.9000 ^b
	menta	6.8148 ^c
Aroma floral	manzanilla	6.3741 ^a
	boldo	1.5630 ^b
	menta	3.4037 ^c
Aroma dulzón	manzanilla	4.7778 ^a
	boldo	1.2852 ^b
	menta	6.3667 ^c
Aroma a yerba seca	manzanilla	3.3444 ^a
	boldo	7.1185 ^b
	menta	2.3407 ^c
Aroma astringente	manzanilla	4.9185 ^a
	boldo	7.9926 ^b
	menta	2.2444 ^c
Refrescante	manzanilla	1.9407 ^a
	boldo	0.8148 ^b
	menta	6.3407 ^c
Gusto dulce	manzanilla	2.4519 ^a
	boldo	0.6778 ^b
	menta	5.1444 ^c
Gusto amargo	manzanilla	2.1815 ^a
	boldo	3.2074 ^b
	menta	0.7667 ^c
Gusto floral	manzanilla	3.3370 ^a
	boldo	0.6963 ^b
	menta	2.3333 ^c
Astringencia	manzanilla	1.1852 ^a
	boldo	6.1444 ^b
	menta	0.5037 ^c
Frescura	manzanilla	0.8889 ^a
	boldo	0.4407 ^b
	menta	6.3074 ^c
Percepción residual amarga	manzanilla	2.3519 ^a
	boldo	3.5889 ^b
	menta	0.9667 ^c
Percepción residual de frescura	manzanilla	0.9370 ^a
	boldo	0.4333 ^b
	menta	9.6370 ^c
Sequedad	manzanilla	2.9481 ^a
	boldo	5.2222 ^b
	menta	0.6815 ^c
Percepción residual metálica	manzanilla	0.3259 ^a
	boldo	0.5444 ^b
	menta	0.2407 ^c

Letras iguales indica que no hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

REFERENCIAS/REFERENCE

- CIVILLE, G.; CARR, B. T.; Meilgaard, M. *Sensory Evaluation Techniques*. 2nd ed. Boca Raton, Fl.: Editorial CRC Press, 1991, p.142 – 199.
- GUERRERO, L. *Métodos descriptivos de análisis sensorial: alimentación, equipos y tecnología*. Madrid, 1995, p. 41 – 46.
- INIA. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. *Plantas de uso medicinal en Chile*. Santiago de Chile, 2001, p.35-39. Publicaciones Técnicas.
- ISO INTERNATIONAL ORGANIZATION for Standardization. *Sensory analysis: Methodology - Evaluation of food products by methods using scales*, ISO 4121, Ginebra, 1987, P.13.
- ISO INTERNATIONAL ORGANIZATION for Standardization. *Sensory analysis: General guidance for the selection, training and monitoring of assessors*. Part 1: Selected assessors. ISO 8586-1, Ginebra, 1993, p.14.
- KATZER, G. 1998. Spice Pages. Online: http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzet/engl/generic_frame.html?Peum_bol.html
- NORAMBUENA, M. *Caracterización química y sensorial de téis digestivos*. Memoria. (Título de Ingeniero en Alimentos. Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas). Universidad de Chile. 1999
- PAMPLONA ROGER, J. D., Enciclopedia de plantas. Madrid Edit. Safeliz, 1996. p.390-391, 366, 364.
- PARIS, R.; MOYSE, H. Collection de Précis de Pharmacie: matière medicale. París, Masson Éditeurs, 1965, v.1, 2 y 3.
- STAHL, E.; SCHILD, W. Pharmazeutische Biologie, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1981
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. Plant Drug Analysis, Berlin, Springer - Verlag, 1984.

Recebido para publicação em 20/08/02. Aprovado em 06/12/02.

Fatores que influenciam o consumo de leite por crianças de 1ª série do ensino fundamental do município de Santa Maria (RS)*

Factors that affect milk intake by children from the first grade of elementary school from Santa Maria (RS)

ABSTRACT

HECK, M. C.; ROSSATO, S.; SANTOS, J. S.; BOGUSZ JUNIOR, S.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Factors that affect milk intake by children from first grade of primary school from Santa Maria, RS. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = *J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP. v.24, p.21-32, dez., 2002

The present study surveyed the average daily intake of milk by children (517) from the first grade of elementary school from Santa Maria (RS) and the factors affecting such intake. Data was obtained using a questionnaire of food consumption frequency. The average daily intake of total milk by children was about 440 mL. Sterilized was the most frequently consumed milk (44%). Daily intake of total milk by children with 1-6 minimum wage familiar income was significantly higher than intake by children with less than 1 minimum wage familiar income. Daily intake of milk by male was significantly higher than intake by female. Total daily intake of milk was negatively correlated with age. However, parents' education did not affect daily milk intake by children. These results indicate that daily intake of milk by children was lower than the recommended. Moreover, in the present study, the main factors that affected milk intake by children were familiar income, sex and age.

Keywords: feeding behavior, milk, family income, age groups, sex factors

MARIA CRISTINA HECK^{1,*},
SIMONE ROSSATO¹,
JOICE SIFUENTES DOS
SANTOS^{2,3}, STANISLAU
BOGUSZ JUNIOR¹, IJONI
COSTABEBER⁴, TATIANA
EMANUELLI⁵.

¹Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia dos
Alimentos.

²Curso de Farmácia e
Bioquímica – Tecnologia
de Alimentos.

³Bolsista de Iniciação
Científica da FAPERGS
(Processo 00513994)

⁴Departamento de
Morfologia, Centro de
Ciências da Saúde,
Universidade Federal de
Santa Maria. Bolsita
Profiz do CNPq
(540032/01-8).

⁵Departamento de
Tecnologia e Ciência de
Alimentos, Centro de
Ciências Rurais,

**Endereço para
correspondência.**

Universidade Federal de
Santa Maria. E-mail:
tati@ccr.ufsm.br. Bolsista
pesquisador do CNPq
(520678/00-1)

Agradecimentos

*Apoio financeiro do CNPq
(Processo 420061/99-1) e
FAPERGS (Processo
99/0303-5).

RESUMEN

El trabajo ha estimado el consumo diario medio de leche por los niños (517) de los cursos iniciales del primer grado de escuelas municipales de Santa Maria (RS) y los factores que influyen en este consumo. Los datos fueron obtenidos por medio de un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario. La cantidad media total de leche consumida por los niños fue alrededor de 440 mL/día. La leche tomada con mayor frecuencia (44%) fue la esterilizada. La cantidad total de leche consumida por los niños con renta familiar entre 1 e 6 salarios mínimos fue significativamente mayor que la cantidad consumida por los niños con renta familiar inferior a 1 salario mínimo. Los niños del sexo masculino presentaron un consumo diario de leche significativamente superior que los del sexo femenino. Se ha observado, también, una correlación negativa significativa entre la edad y la cantidad total de leche consumida. Sin embargo, el grado de escolaridad de los padres no ha afectado el consumo. Estos resultados indican que la cantidad de leche consumida por los niños estaba por debajo de la recomendada y que la renta familiar, el sexo y la edad fueron los principales factores que afectaron el consumo de la leche en este estudio.

Palabras clave: conducta alimentaria, leche, ingreso familiar, grupos por edad, factores sexuales

RESUMO

O presente trabalho estimou o consumo médio diário de leite por crianças (517) de 1ª série do ensino fundamental do Município de Santa Maria (RS) e os fatores que podem influenciar este consumo. Os dados foram levantados através de um questionário de frequência de consumo. O consumo médio diário total de leite pelas crianças foi cerca de 440 mL. O leite consumido com maior frequência (44%) foi o esterilizado. O volume total de leite consumido pelas crianças com renda familiar entre 1 e 6 salários mínimos foi significativamente maior que o volume consumido por crianças com renda familiar inferior a 1 salário mínimo. As crianças do sexo masculino apresentaram um consumo diário de leite significativamente superior às do sexo feminino. Observou-se também uma correlação negativa significativa entre a idade e o volume total de leite consumido. No entanto, o grau de escolaridade dos pais não afetou o consumo. Esses resultados indicam que o volume de leite consumido pelas crianças estava abaixo do recomendado, e que a renda familiar, o sexo e a idade foram os principais fatores que afetaram o consumo de leite neste estudo.

Palavras chave: conduta na alimentação, leite, renda familiar, grupos por idade, fatores sexuais

INTRODUÇÃO

Do ponto de vista bioquímico, o leite é um dos fluídos mais complexos que existem. De um modo geral, a composição química do leite de diferentes espécies é bastante semelhante. Embora o leite de muitas espécies seja explorado pelo homem, os leites de outros mamíferos não são considerados tão adequados à nutrição humana, pois o leite humano é o alimento ideal, especialmente nos primeiros meses de vida, devido às suas propriedades nutricionais e anti-infecciosas, além das vantagens psicossociais da prática do aleitamento para a mãe e seu filho (KUNZ *et al.*, 1999). Entre os leites explorados comercialmente o bovino se destaca em produção e consumo e, por isso, merece maior atenção quanto aos seus efeitos sobre a saúde do homem (DUARTE *et al.*, 2000).

O leite de vaca apresenta uma quantidade muito maior de proteínas que o leite humano, sendo considerado como uma excelente fonte nutricional de proteínas de alta qualidade, por causa da sua composição única de aminoácidos (HARWALKAR e MCMAHON, 1993). A lactose, o principal açúcar do leite de vaca, permanece maior tempo no intestino delgado, devido a sua lenta hidrólise, favorecendo a redução do pH fecal, o que é considerado um fator de proteção contra o câncer de cólon, além de favorecer a absorção de cálcio, inibir a ação das bactérias putrefativas e desempenhar um importante papel como fonte persistente de energia (SAMELSON, 1985). A gordura, que é considerada a maior fonte de energia do leite, possui uma composição bastante complexa, tendo sido identificados mais de 400 tipos de ácidos graxos (JENSEN *et al.*, 1991), cujos componentes são muito importantes do ponto de vista nutricional, organoléptico e funcional (GERMAN e DILLARD, 1998). A concentração de minerais necessários à nutrição humana, com exceção do ferro, é mais elevada no leite bovino que no leite humano (VARNAM e SUTHERLAND, 1995). O leite é considerado a principal fonte de cálcio, mineral essencial para a formação óssea (FLEMING e HEIMBACH, 1994).

Desse modo, a importância nutricional do leite e seus derivados deve-se ao papel que desempenham na alimentação humana como provedores de certos nutrientes, bem como à distribuição equilibrada e à fácil metabolização dos componentes do leite. Embora o leite de vaca seja um alimento essencial na alimentação humana, em alguns casos o seu consumo pode provocar efeitos adversos. A maior quantidade de proteínas heterólogas torna o leite bovino um potente agente antigênico, podendo provocar reações alérgicas, especialmente em crianças (SHARMA *et al.*, 2001; HEINE *et al.*, 2002; EXL e FRITSCHÉ, 2001). O maior conteúdo de sais minerais configura sobrecarga para lactentes, que por vezes não conseguem manter a homeostasia (LESSOF, 1996). De acordo com a OMS (1985), as recomendações para consumo diário de leite seriam: para crianças abaixo de 9 anos, 2-3 xícaras (0,5 litro/dia); para crianças de 9 a 12 anos, 3 ou mais xícaras (0,75 litros/dia); para adolescentes, 4 ou mais xícaras (1 litro/dia); e para adultos, 2 ou mais xícaras (0,5 litro/dia).

Visto que é na infância que devem ser estabelecidos os bons hábitos alimentares que continuarão na adolescência e na vida adulta, é muito importante nesta etapa identificar quais são as necessidades nutricionais para o crescimento e desenvolvimento

adequados e os fatores que influenciam a oferta adequada de energia e nutrientes. As necessidades nutricionais da criança dependem de fatores relacionados a reservas corpóreas, faixa etária, sexo, velocidade de crescimento, doença de base, estado nutricional, estado metabólico e a presença de riscos nutricionais (DELGADO *et al.*, 2000).

Observa-se que, na nutrição infantil, o hábito ou comportamento alimentar tem sido determinado em primeira instância pela família, da qual ela é dependente, e em segundo plano por outras interações psicossociais e culturais da criança, como amigos, televisão, atividades e escola (PUCHOC, 1998). No entanto, já tem sido demonstrado que o fator econômico representa a variável decisiva na determinação do consumo alimentar e, por conseguinte, do valor da dieta (ARRUDA, 1984), pois o poder de compra da família pode definir, em instância final, o que deve ser comprado e, sobretudo, em que proporções. Outros fatores determinantes do consumo alimentar incluem características culturais e credences que podem acompanhar o consumo, restringindo e adequando a influência do determinismo econômico sobre os hábitos alimentares (MUSAIGER, 1993; VALIENTE *et al.*, 1988)

Ao examinar a literatura especializada na área, verifica-se que a produção intelectual voltada à análise do consumo de leite por crianças em faixas etárias específicas é reduzida, justificando a realização de estudos desta natureza.

O presente trabalho teve por objetivo estimar o consumo médio diário de leite por crianças da 1ª série do ensino fundamental do Município de Santa Maria (RS) e os fatores que influenciam o consumo do mesmo.

MÉTODOS

Foi aplicado um questionário aos escolares de 1ª série do ensino fundamental de escolas municipais, estaduais e particulares de Santa Maria-RS, nos meses de março até julho de 2001. No processo de amostragem, o total de escolas do município de Santa Maria (108) foi classificado quanto ao tipo de administração em três subgrupos: municipais (46), estaduais (35) e particulares (27). Aceitaram participar do estudo 22 escolas municipais, 28 escolas estaduais e 7 escolas particulares. A seleção sobre os diversos subgrupos foi realizada de modo aleatório, de forma independente sobre o total de alunos pertencentes às escolas que permitiram realizar a pesquisa (1390 alunos em escolas municipais, 1658 alunos em escolas estaduais e 566 alunos em escolas particulares). Foram distribuídos no total 720 questionários, sendo que 71,8 % destes retornaram corretamente preenchidos. Desta forma, a amostra ficou constituída de um total de 517 alunos, sendo 225 alunos de escolas municipais, 229 de escolas estaduais e 63 de escolas particulares, o que representa uma precisão de medida de cerca de 4%.

Com o consentimento da direção das escolas, foi entregue às crianças o questionário juntamente com uma carta explicativa aos pais, orientando o preenchimento. A compreensão do questionário utilizado, bem como da carta explicativa foi previamente testada durante um estudo piloto com pais de diferentes graus de escolaridade, tendo

apresentado resultados satisfatórios. Para não comprometer os resultados encontrados, os questionários que deixaram dúvidas nas informações ou não estavam devidamente preenchidos foram desconsiderados. O questionário continha perguntas sobre características sócio-econômicas: idade, peso, altura, sexo, tipo de escola freqüentada pela criança, escolaridade dos pais, renda familiar, tipo e quantidade de leite consumido pela criança. As questões referentes ao tipo e quantidade de leite consumido foram formuladas utilizando inquérito de freqüência de consumo semanal (CINTRA *et al.*, 1997). As porções de referência utilizadas para avaliar a quantidade de leite consumido foram copos (200 mL), xícaras (150 mL) e mamadeiras (200 mL). O inquérito de freqüência de consumo semanal, juntamente com as demais questões, propiciou a análise dos possíveis fatores interferentes no consumo de leite pela população estudada.

Os dados referentes à freqüência e quantidade de leite consumido, em função da idade, sexo, renda familiar, escolaridade dos pais e tipo de escola freqüentada foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student e ANOVA de uma via (testes paramétricos para variáveis de distribuição linear).

RESULTADOS

A idade média das crianças entrevistadas foi de 6,7 anos, com peso médio de 26,3 kg e altura média de 1,24 m. A idade mínima observada foi de 5 e a máxima de 12 anos, sendo que 0,53% das crianças tinham menos de 6 anos, 87,9% tinham de 6 anos a 8 anos e 11,52% das crianças tinham mais de 8 anos. O peso mínimo observado foi de 17 e o máximo de 50 kg, enquanto a altura mínima observada foi de 1,10 e a máxima de 1,45 m.

A Tabela 1 apresenta a distribuição de freqüência do tipo de leite indicado como mais consumido pelas crianças entrevistadas. O tipo de leite consumido com maior freqüência foi o esterilizado (43,7%), seguido do pasteurizado (23,8%) e do “*in natura*” (17,2%). Foi bastante reduzido o percentual de crianças que indicaram consumir outros tipos de leite (leite em pó e leite de soja). Em virtude deste fato os dados de consumo destas crianças não foram incluídos nas análises estatísticas subseqüentes. Destaca-se que cerca de 5% das crianças entrevistadas consumiam mais de um tipo de leite, enquanto que 5% das crianças não consumiam nenhum tipo de leite.

A Tabela 2 apresenta os dados sobre o consumo médio diário dos diferentes tipos de leite. Foi estimado o consumo médio diário pela amostra total das crianças e, considerando-se que a inclusão de crianças com consumos extremos de leite poderia levar à obtenção de valores que não correspondem ao consumo médio real, também foi estimado o consumo eliminando as crianças que não consomem leite, bem como aquelas que indicaram um valor extremo de consumo de leite. Para a amostra total de crianças, o consumo de leite esterilizado foi significativamente maior que o de leite “*in natura*” [F(2, 567)=5,92, p<0,05]. Na amostra constituída apenas de crianças consumidoras de leite o consumo de leite esterilizado foi significativamente maior que o de leite “*in natura*” e pasteurizado [F(2,480)=10,77, p<0,05]. Observou-se que o

TABELA 1 Distribuição de frequência do tipo de leite indicado como mais consumido pelas crianças entrevistadas

Tipo de leite	Frequência	Porcentagem
" <i>In natura</i> "	89	17,21
Pasteurizado	123	23,79
Esterilizado	226	43,71
" <i>In natura</i> "/Pasteurizado	6	1,16
" <i>In natura</i> "/Esterilizado	10	1,93
Pasteurizado/Esterilizado	11	2,13
Leite em pó	3	0,58
Leite de soja	2	0,39
Não consome	26	5,03
Não respondeu	21	4,06
Total	517	100,00

TABELA 2 Valores médios e erro padrão da quantidade de leite consumido diariamente pelas crianças do município de Santa Maria, RS

Variável	Volume médio (mL) da amostra total (N) ¹	Volume médio (mL) apenas das crianças consumidoras (N) ²
Total de leite " <i>In natura</i> "	302,59 ^a ± 23,91 (0,00 - 1428,57) (131)	367,41 ^a ± 22,96 (21,43 - 1000,00) (104)
Total de leite pasteurizado	363,06 ^{a,b} ± 32,93 (0,00 - 2142,85) (166)	346,80 ^a ± 19,97 (21,43 - 1000,00) (133)
Total de leite esterilizado	424,66 ^b ± 18,86 (0,00 - 2000,00) (273)	463,14 ^b ± 17,70 (21,43 - 1000,00) (246)

Os dados são apresentados como: média ± erro padrão (mínimo - máximo).

Os valores que na mesma coluna não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

¹No cálculo do volume médio da amostra total considerou-se todas as crianças que indicaram consumir o tipo específico de leite em questão, bem como aquelas que indicaram não consumir nenhum tipo de leite.

²No cálculo do volume médio apenas das crianças consumidoras foram eliminadas as crianças que não consomem leite (26), bem como aquelas que indicaram valores extremos de consumo de leite (9), identificadas na análise estatística.

consumo médio diário de leite, englobando todos os tipos de leite consumidos, foi de 439,59 mL para a amostra total de crianças (incluindo os indivíduos que não consomem), enquanto que para a amostra composta apenas pelas crianças consumidoras, eliminando-se os extremos, este valor foi de 436,97 mL.

TABELA 3 Valores médios e erro padrão da quantidade de leite consumido diariamente, segundo o sexo, pelas crianças do município de Santa Maria, RS

Sexo	Número# (%)	Volume total de leite (mL) (N)	Volume total de leite "In natura" (mL) (N)	Volume total de leite pasteurizado (mL) (N)	Volume total de leite esterilizado (mL) (N)
Masculino	270 (52,73)	468,52 ± 21,88 ^a (260)	338,60 ± 35,75 (63)	402,30 ± 48,25 (82)	450,60 ± 24,66 (148)
Feminino	242 (47,27)	407,03 ± 22,13 ^b (231)	269,22 ± 31,72 (68)	322,87 ± 44,60 (82)	393,94 ± 28,90 (125)

*Número de crianças entrevistadas.

Os valores que na mesma coluna não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Foi realizada análise de correlação linear entre a quantidade total de leite consumida e a idade das crianças. Observou-se uma correlação negativa significativa ($p < 0,05$) entre a idade e o volume total de leite consumido ($r = -0,112$, $p = 0,013$).

O teste t Student foi realizado para avaliar as diferenças no consumo diário total de leite em função do sexo da criança (Tabela 3). Observou-se que o sexo masculino consumia maior volume total de leite diariamente que o sexo feminino ($p < 0,05$). No entanto, não foram observadas diferenças entre os sexos em relação ao consumo de tipos específicos de leite ("in natura", pasteurizado, esterilizado). Este fato provavelmente pode estar relacionado a uma redução no N (nº de indivíduos entrevistados) quando o consumo de leite foi classificado de acordo com o tipo.

A renda média familiar das crianças entrevistadas foi de 595,15 reais (3,3 salários mínimos). Observou-se, no entanto, uma grande diferença entre a renda mínima (zero) e a máxima (R\$ 3.500,00 reais). A renda familiar de crianças de escolas municipais (R\$ 419,44 ± 28,10) foi significativamente inferior ($p < 0,05$) à renda familiar de crianças de escolas estaduais (R\$ 665,92 ± 36,15) e particulares (R\$ 972,06 ± 115,79). A análise de correlação linear entre a quantidade de leite consumida e a renda familiar não revelou uma correlação significativa entre estes dois fatores.

A Tabela 4 apresenta a distribuição de frequência da renda familiar e a relação entre a renda familiar e o volume de leite consumido diariamente pelas crianças. Na distribuição de frequência da renda familiar (com salário mínimo de referência de 180,00 reais), verificou-se que a renda da maior parte das famílias estava na faixa de 0 até 1 salário

TABELA 4 Valores médios e erro padrão da quantidade de leite consumido diariamente, segundo a renda familiar, pelas crianças do município de Santa Maria, RS

Renda Familiar (salário) [#] (mL)	Número [#] (%)	Volume total de leite (mL) (N)	Volume total de leite "In natura" (mL) (N)	Volume total de leite pasteurizado (mL) (N)	Volume total de leite esterilizado (mL) (N)
Até 1	191 (37,31)	352,07 ± 35,87 ^a (95)	193,72 ± 37,77 ^a (33)	319,91 ± 55,99 (54)	287,60 ± 51,45 ^a (34)
>1 até 3	88 (17,19)	470,80 ± 29,19 ^b (183)	363,39 ± 38,54 ^b (48)	464,12 ± 64,24 (65)	418,98 ± 34,40 ^b (92)
> 3 até 6	70 (13,67)	507,79 ± 29,42 ^b (89)	375,00 ± 73,23 ^b (19)	402,94 ± 47,19 (17)	535,96 ± 38,00 ^c (58)
> 6	60 (11,72)	415,61 ± 27,88 ^{ab} (69)	340,05 ± 67,02 ^b (13)	251,34 ± 63,94 (8)	398,60 ± 31,78 ^{ab} (56)

*A renda familiar está apresentada em base de salário mínimo, correspondente a R\$ 180,00. Os valores que na mesma coluna não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

mínimo (37,3%) e de 1 até 3 salários (17,2%). Houve diferenças estatísticas significativas no volume de leite consumido em função da renda familiar. O volume total de leite consumido pelas crianças cuja renda familiar estava na faixa de até 1 salário foi significativamente menor que o volume consumido pelas crianças com renda familiar entre 1 e 6 salários. Para o leite "in natura" o volume de leite consumido pelas crianças cuja renda familiar estava na faixa de até 1 salário foi menor que o volume consumido pelas crianças cuja renda familiar estava acima desta faixa. O volume de leite pasteurizado consumido pelas crianças não variou significativamente entre as diferentes faixas de renda familiar. O leite esterilizado foi consumido em maior quantidade por crianças cuja renda familiar estava na faixa de 3 até 6 salários; e as crianças cuja renda familiar estava na faixa de 1 até 3 salários consumiam mais leite esterilizado que as crianças com renda familiar inferior.

A Tabela 5 apresenta a distribuição de frequência do tipo de escola freqüentada pela criança, bem como a relação entre o tipo de escola freqüentada e a quantidade de leite consumida por dia pelas crianças. Observou-se que o consumo de leite foi maior nas escolas particulares e estaduais, embora tenham sido observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) somente para o leite esterilizado.

Avaliando-se a escolaridade dos pais das crianças pesquisadas, observou-se um pequeno percentual de pais analfabetos (aproximadamente 1%). O 1º Grau foi o nível de escolaridade de maior frequência (50%), tanto para os pais como para as mães. Para o 2º Grau e o nível superior observou-se uma distribuição de frequência um pouco mais elevada para as mães. O grau de escolaridade do pai e da mãe não alterou a quantidade de leite consumida diariamente pelas crianças.

TABELA 5 Valores médios e erro padrão da quantidade de leite consumido diariamente, segundo o tipo de escola, pelas crianças do município de Santa Maria, RS

Tipo de Escola	Número# (%)	Volume total de leite (mL) (N)	Volume total de leite "In natura" (mL) (N)	Volume total de leite pasteurizado (mL) (N)	Volume total de leite esterilizado (mL) (N)
Municipal	224 (43,75)	413,63 ± 24,83 (208)	262,32 ± 30,46 (69)	375,25 ± 47,94 (86)	360,24 ± 30,27 ^a (99)
Estadual	227 (44,34)	456,71 ± 65,24 (222)	338,50 ± 42,85 (50)	341,89 ± 49,49 (63)	462,68 ± 26,61 ^b (51)
Particular	61 (11,91)	465,81 ± 66,54 (61)	384,52 ± 68,68 (12)	379,83 ± 110,08 (17)	456,39 ± 52,43 ^b (38)
Total	512 (100,00)	439,59 ± 15,61 (491)	302,59 ± 23,91 (131)	363,06 ± 32,93 (166)	424,66 ± 18,86 (273)

Os valores que na mesma coluna não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de demonstrar quais são os fatores que influenciam as escolhas e hábitos alimentares de crianças, sendo importante a realização de avaliações em diferentes regiões em virtude da grande especificidade de cada uma delas. Na bibliografia consultada não foram encontrados estudos realizados neste sentido, no RS. HURSTI (1999) e FISHER *et al.* (2000) demonstraram a influência do consumo alimentar dos pais sobre os filhos; BIRCH (1998) avaliou a influência de fatores fisiológicos; EGGER *et al.* (1991) avaliaram a influência de fatores sócio-econômicos, enquanto autores como SANTOS *et al.* (1995) e SHATENSTEIN *et al.* (1996) avaliaram a influência da localização geográfica sobre hábitos alimentares de crianças.

A diferença de consumo entre os tipos de leite observada no presente estudo sugere possíveis implicações socio-econômicas e culturais. A maior frequência de consumo do leite esterilizado, observada no presente estudo, pode estar associada a fatores considerados relevantes para o consumidor, como demonstra a pesquisa realizada por CASSOTTI *et al.* (1999) em que a praticidade de manuseio, a maior vida útil, assim como a qualidade do produto em relação aos aspectos nutricionais, organolépticos e assépticos conduzem à preferência por alimentos em embalagens tipo longa vida, como a do leite esterilizado. É importante ressaltar o considerável consumo de leite "in natura", identificado no presente estudo, que pode representar risco de transmissão de doenças para o consumidor (BALTER *et al.*, 2000).

Algumas pesquisas realizadas no Brasil (MONDINI e MONTEIRO, 1994) detectaram mudanças na escolha dos alimentos ao longo das décadas de 60, 70 e 80, demonstrando um incremento no consumo de alimentos como leite e derivados. No entanto, conforme os resultados deste estudo, o consumo médio de leite pelas crianças ficou abaixo das recomendações da OMS (1985) para a faixa etária pesquisada (500 mL/dia). Outros estudos, como os realizados por WEIN *et al.* (1992) e LERNER *et al.* (2000), também avaliaram o consumo de leite por crianças e observaram que a ingestão estava abaixo dos limites recomendados.

MUSAIGER e GREGORY (1992) observaram uma diminuição no consumo de alguns alimentos com o aumento da idade, assim como diferenças no consumo entre os sexos o que está de acordo com o observado neste estudo. LERNER *et al.* (2000) igualmente observaram um maior consumo de leite pelas crianças do sexo masculino que pelas crianças do sexo feminino, enquanto GAME *et al.* (1996) também verificaram uma diminuição na frequência de consumo de leite com a idade.

A análise da frequência de distribuição da renda familiar demonstrou que mais de 50% das famílias entrevistadas possui renda igual ou inferior a 3 salários mínimos (540,00 reais), demonstrando a baixa renda familiar da população brasileira. A influência do padrão sócio-econômico na preferência de consumo dos diferentes tipos de leite, observada no presente estudo, está de acordo com outros trabalhos realizados que avaliaram a relação entre este fator e a preferência de consumo de determinados alimentos, como vegetais (BAXTER *et al.*, 1999). Da mesma forma, OLIVEIRA e THÉBAUD-MONY (1998) observaram que o consumo de tipos de leite de maior custo (pasteurizado tipo B), bem como de derivados lácteos, é menor em populações de baixa renda do que em populações de média renda. O maior consumo de leite esterilizado observado nas escolas particulares e estaduais possivelmente está relacionado à maior renda familiar encontrada nessas escolas, quando comparadas às municipais.

Mesmo não tendo sido observada neste estudo a influência do nível educacional dos pais sobre o volume de leite consumido pelas crianças pesquisadas, outros trabalhos já demonstraram uma relação direta entre a prevalência de padrão de desnutrição e a escolaridade dos pais (RIBAS *et al.*, 1999).

Mudanças nos hábitos alimentares têm sido observadas ao longo das últimas décadas, fazendo-se necessária a realização de estudos atuais que visem avaliar os diversos aspectos (econômicos, sociais, culturais e nutricionais) que têm influenciado estas mudanças e a diversificação nos padrões de alimentação, de acordo com as especificidades de cada país ou região, e segundo as suas conseqüências.

No presente estudo, o consumo de leite foi influenciado pela renda familiar, idade e sexo, mas aparentemente não pelo grau de escolaridade dos pais. O consumo diário de leite abaixo da ingestão recomendada, observado no presente trabalho, evidencia um possível problema relativo ao não atendimento das necessidades nutricionais destas crianças, embora não se tenha levantado o consumo de outros alimentos que possam vir a suprir o aporte energético nutricional recomendado para esta faixa etária. Além

disso, o fato do consumo diário de leite ter ficado abaixo do recomendado, inclusive em crianças de renda familiar mais elevada, sugere a avaliação da necessidade de medidas educativas, tais como a orientação aos pais e escolares no sentido de verificar e adequar as recomendações nutricionais preconizadas para este grupo. Tais medidas poderiam também ser direcionadas no sentido de aumentar o consumo de leite por crianças de faixa etária mais elevada e por crianças do sexo feminino, em função de ter sido observado que estes foram os grupos que apresentaram menor consumo de leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCE

- ARRUDA, B.K. A política alimentar e nutricional brasileira. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRICIÓN, 7º, Brasília. *Anais*. São Paulo: FUNEP, 1984.
- BAXTER, I.A.; SCHRODER, M.J.A.; BOWER, J. A. The influence of socio-economic background on perceptions of vegetables among Scottish primary school children. *Food Qual. Prefer.* v.10, n.4-5, p.261-272, 1999.
- BIRCH, L. Psychological influences on the childhood diet. *J. Nutr.* v.2S, n.128, p.407-410, 1998.
- CASSOTTI, L.; SANTOS, C.F.; RIBEIRO, P.C. Comportamento do consumidor e características das embalagens. *Rev. Leite e Deriv.* v.45, p.32-39, 1999.
- CINTRA, I.P.; HEYDE, M.E.; SCHMITZ, B.A. S.; FRANCESCINI, S.C.C.; TADDEL, J.A.; SIGULEM, D.M. Métodos de inquéritos dietéticos. *Cad. Nutr.* v.13, p.11-23, 1997.
- DELGADO, A. F.; FALCÃO, M. C.; CARRAZZA, F. R. Princípios do suporte nutricional em pediatria. *J. Ped.* v.76, n.3, p.330-338, 2000.
- DUARTE, P.; COPPI, L.; ROSALEN, P. Carcinogenicidade e propriedades cariostáticas por diferentes tipos de leite: revisão. *Arch. Latinoam. Nutr.* v.50, n.2, p.113-120, 2000.
- EGGER, R.J.; HOFHUIS, E.H.; SUKONTHANYAKORN, B.; VANDER VEN, E.M.; SCRIBOONLUE, P.; WEDEL, M. SAOWAKONTHA; S. SCHREURS, W. Food intake and socio economic status in children in northeast Thailand. *Trop. Geogr. Med.* v.43, n.1-2, p.42-50, 1991.
- EXL, B.M.; FRITSCHÉ, R. Cow's milk protein allergy and possible means for its prevention. *Nutrition.* v.17, n.7/8, p.642-651, 2001.
- FISHER, J.O.; MITCHELL, D.C.; WRIGHT, H.S.; BIRCH, L. L. Maternal milk consumption predicts the trade of between milk and soft drinks in young girls' diets. *J. Nutr.* v.2, n.131, p.246-250, 2000.
- FLEMING, K.H.; HEIMBACH, J.T. Consumption of calcium in the U.S: Food sources and intake levels. *J. Nutr.* v.124, p.1426S- 1430S, 1994.
- GAME, J. H; MARINCOVICH, R. J.; SANTAMNA, M. C. D.; MARINCOVICH, D. I. Food habits of rural school children from Chile's Metropolitan Region. A comparative study 1989. *Arch. Latinoamer. Nutr.* v.3, n.46, p.183-189, 1996.
- GERMAN, B.J.; DILLARD, C.J. Fractionated milk fat: Composition, structure and functional properties. *Food Techn.* v.52, n.2, p.33-38, 1998.
- HARWALKAR, V.R.; McMAHON, D.J. Symposium: Biological and food functional characteristics of milk protein hydrolysis products. *J. Dairy Sci.* v.76, p.300, 1993.
- HEINE, R.G.; ELSAYED, S.; HOSKING, C.; HILL, D. J. Cow's milk allergy in infancy. *Current Opinion Allergy Clinical Immunological.* v.2, n.3, p.217-225, 2002.
- HURSTI, U.K.K. Factors influencing children's food choice. *Ann. Med.* v.31, p.26-32, 1999.

- JENSEN, R.G.; FERRIS, A.M.; LAMMI-KEEFE, C. J. Milk fat composition, function and potential change – The composition of milk fat. *J. Dairy Sci.* v.74, p.3228-3243, 1991.
- KUNZ, C.; RODRIGUEZ-PALMERO, M.; KOLETZKO, B.; JENSEN, R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins and carbohydrates. *Clin. Perin.* v.26, n.2, p.307-333, 1999.
- LERNER, B.R.; LEI, D.L.; CHAVES, S.P.; FREIRE, R.D. O cálcio consumido por adolescentes de escolas públicas de Osasco, São Paulo. *Revista de Nutrição.* v.13, n.1, p.57-63, 2000.
- LESSOF, M.H. *Alergia e intolerancia a los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1996.
- MONDINI, L.; MONTEIRO, C.A. Changing diet patterns in Brazil (1962-1988). *Rev. Saúde Pública.* v.28, n.6, p.433-439, 1994.
- MUSAIGER, A.O.; Sócio-cultural and economic factors affecting food consumption patterns in the Arab countries. *J. Royal Soc. Helth.* v.113, n.2, p.68-74, 1993.
- MUSAIGER, A.O.; GREGORY, W.B. Dietary habits of schoolchildren in Bahrain. *J. Royal Soc. Helth.* v.112, n.4, p.159-162, 1992.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Necessidades de energia e de proteínas*. Geneva, OMS, 1985. (Informe técnico, 724).
- OLIVEIRA, S.P.; THÉBAUD-MONY, A. Hábitos e práticas alimentares em três localidades da cidade de São Paulo (Brasil). *Rev. Nutr.* v.11, n.1, p.37-50, 1998.
- PUCHOC, C. E. Alimentação infantil sem crise. *Vida e Saúde.* M 8-10, 1998.
- RIBAS, D. L.; PHILIPPI, T.; TANAKA, A.; ZOZATTO, J. Saúde e estado nutricional infantil de uma população da região Centro-Oeste do Brasil. *Rev. Saúde Pública.* v.33, n.4, p.354-365, 1999.
- SAMELSON, S. L. Protective role of faecal pH in experimental colon carcinogenesis. *J. Royal Soc. Med.* v.78, p.230-233, 1985.
- SANTOS, L.M.P.; ASSIS, A.M.O.; MARTINS, M.C.; ARAUJO, M.P.N.; MORRIS, S.S.; BARRETO, M. L. Nutritional status of pré-school children of the semi-arid region of Bahia (Brazil). 1. Anthropometric status. *Rev. Saúde Pública.* v.6, n.29, p.463-471, 1995.
- SHARMA, S.; KUMAR, P.; BETZEL, C.; SINGH, T. P. Structure and function of proteins involved in milk allergies. *J. Chrom. Biom. Sci. Appl.* v.756, n.1-2, p.183-187, 2001.
- SHATENSTEIN, B.; ABUSHAABAN, D.; PASCUAL, M. L.; KARK, J. D. Dietary adequacy among urban and semirural schoolchildren in Gaza. *Ecol. Food and Nutr.* v.35, n.2, p.135-148, 1996.
- VALIENTE, S.; ABALA, C.; AVILA, B.; MONCKEBERG, F. Nutritional pathology in Latin América and the Caribbean. *Arch. Latinoam. Nutr.* v.38, n.3, 1988.
- VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Leche y productos lácteos: tecnologia, química y microbiologia. Zaragoza: Acribia, 1995.
- WEIN, E.E.; GEE, M.I.; HAWRYSH, Z.J. Food consumption patterns of native school children and mothers in Northern Alberta. *J. Can. Diet. Assoc.* v.53, n.4, p.267-273, 1992.

Recebido para publicação em 26/03/02. Aprovado em 06/12/02.

Dietas hiperlipídicas e frequência alimentar: efeitos sobre as reservas lipídicas em ratos

Fat enriched diets and meal feeding: effects on body fat in rats

ABSTRACT

FRANCISCHI, R.P.; PEREIRA, L.O.; CAMPOS, P.L.; SAWADA, L.A., COSTA, A.S.; ROSCHEL, H.A.S.; MARQUEZI, M.L.; SCAGLIUSI, F.B.; PEREIRA, P.M.; LANCHÁ JÚNIOR, A.H., Fat enriched diets and meal feeding: effects on body fat in rats. *Nutrire. rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP. v.24, p.33-50, dez., 2002.

The aim of this study was to evaluate the body composition, food intake and glucose tolerance in female rats consuming meal feeding associated to fat enriched diets (FE). Female Wistar rats were distributed into: C2b (gorging control, one meal a day with stock diet for 2h/day); FE2b (gorging fat, one meal a day with fat rich diet for 2h/day); C24b (nibbling control, ad libitum access to stock diet); FE24b (nibbling fat, ad libitum access to fat rich diet). FE diet groups ate less than control groups, although they presented a similar energy intake. Gorging animals ate only about 62% of the calories consumed by nibbling ones. After 8 weeks, FE24b was the heaviest group, and both gorging groups presented the same weight, lower than nibbling groups. FE animals showed heavier fat depots than controls, but FE24b was the heaviest one. Lipid incorporation into the body carcass was the similar among FE2b, C24b and FE24b, which was higher than C2h. Control animals showed lower glucose curve during oral glucose tolerance test than FE ones. Despite the same energy intake observed between C2b and FE2b and between C24b and FE24b, FE diet animals were more efficient in store excess energy as body fat. FE2h presented the same body fat as C24b and FE24b, even though FE2b showed less energy intake, demonstrating energy economy in gorging pattern. Heavier body fat was more dependent on the high lipid content and lower feeding bouts than on energy intake. Other metabolic disorders originated from these feeding behaviors may be involved and should be evaluated.

Keywords: Biochemical phenomena, Metabolism and Nutrition; Feeding behavior; Obesity; Wistar rats

RACHEL PAMFÍLIO FRANCISCHI¹, LUCIANA OQUENDO PEREIRA¹, PATRÍCIA LOPES CAMPOS², LETÍCIA AIKO SAWADA³, ANDRÉ DOS SANTOS COSTA³, HAMILTON AUGUSTO SILVA ROSCHEL⁴, MARCELO LUÍS MARQUEZI², FERNANDA BALZA SCAGLIUSI⁵, PERLA MENEZES PEREIRA⁵, ANTONIO HERBERT LANCHÁ JÚNIOR⁶.

^{1,2,4} Inst. de Biologia da Univ. Est. de Campinas (IB-UNICAMP);

^{3,5,6} Esc. de Educ. Física e Esporte da Univ. de São Paulo (EEFE-USP)

Bolsista de Iniciação Científica da EEFE-USP

Endereço para correspondência:

Rachel Pamfílio Francischi,
Rua Orlando Murgel, 472,
São Paulo - SP
CEP: 04358-090.

e-mail:

racnutri@hotmail.com
Trabalho desenvolvido no Depto. de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano da Escola de Educ. Física e Esporte da Univ. de São Paulo (EEFE-USP)

*: Resultados apresentados parcialmente no Congr. da Soc. Bras. de Alim. e Nutr. 6º, set. 15-19, 2001, Florianópolis, SC. Brasil.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la composición corporal, el consumo alimentario y la tolerancia a la glicosis de ratones sometidos a diferentes frecuencias de ingestión alimentaria asociadas a dietas hiperlipídicas (HL). Ratones Wistar fueron acompañados durante 8 semanas divididos en: C2h (control "gorging", con ingestión de ración comercial 1x/día durante 2 h/día); HL2h (HL "gorging", con consumo de HL 1x/día por 2h/día); C24h (control "nibbling", con acceso 24h/día a la ración comercial) y HL24h (HL "nibbling", con acceso 24h/día a la ración HL). Los grupos con dieta HL ingirieron menos alimento que los controles, sin embargo con la misma ingestión energética. Los Animales "gorging" ingirieron apenas cerca del 62% de las calorías consumidas por los "nibbling". Después de 8 semanas, el HL24h presentó el mayor peso, siendo que ambos "gorging" llegaron al mismo peso, inferior a los "nibbling". En los animales con dieta HL, fueron mayores los depósitos de grasas, siendo que el HL24h presentó la mayor reserva. En cuanto a la incorporación lipídica en el esqueleto del animal, HL2h presentó el mismo tenor que C24h y HL24h, mayor que C2h. Los animales controles presentaron curvas glicémicas menores que los HL. Apesar del consumo energético semejante entre C2h y HL2h y entre C24h y HL24h, se nota eficiencia en la reserva de glipídios y peso corporal en HL. Mismo ingiriendo menos energía, HL2h incorporó el mismo tenor de lípideos que C24h y HL24h, lo que reveló una economía energética en el patrón "gorging". Las mayores reservas de grasa corporal dependieron más del alto tenor lipídico y de la baja frecuencia alimentaria que de la ingestión energética. Otras alteraciones metabólicas pueden estar envueltas como consecuencia de estos comportamientos alimentarios y deben ser evaluados.

Palabra-clave: fenomenos bioquimicos, Metabolismo y Nutricion; Conducta alimentaria; Obesidad; Ratas Wistar

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a composição corporal, consumo alimentar e tolerância à glicose de ratas submetidas a diferentes frequências de ingestão alimentar associadas a dietas hiperlipídicas (HL). Ratas Wistar foram acompanhadas por 8 semanas divididas em: C2h (controle intermitente, com ingestão de ração comercial 1x/dia durante 2h/dia); HL2h (HL intermitente, com consumo de HL 1x/dia por 2h/dia); C24h (controle fracionado, com acesso 24h/d à ração comercial) e HL24h (HL fracionada, com acesso 24h/d à ração HL). Os grupos com dieta HL ingeriram menos alimento que os controles, porém com mesma ingestão energética. Animais com apenas 2h de acesso diário ao alimento ingeriram apenas cerca de 62% das calorías consumidas pelos animais com ingestão "ad libitum". Após 8 semanas, HL24h apresentou o maior peso, sendo que os ambos grupos com alimentação intermitente atingiram o mesmo peso, inferior aos animais com alimentação fracionada. Nos animais com dieta HL, foram maiores os depósitos de gordura, sendo que HL24h apresentou o maior estoque. Quanto à incorporação lipídica na carcaça, HL2h apresentou o mesmo teor que C24h e HL24h, maior que C2h. Os animais controle apresentaram menores valores glicêmicos que os HL durante o teste oral de tolerância oral à glicose. Apesar do consumo energético semelhante entre C2h e HL2h e entre C24h e HL24h, nota-se eficiência em estoque de lipídios e peso corporal em HL. Mesmo ingerindo menos energia, HL2h incorporou o mesmo teor de lipídios que C24h e HL24h, o que revelou economia energética do padrão esporádico de alimentação. Os maiores estoques de gordura corporal foram mais dependentes do alto teor lipídico e da baixa frequência alimentar do que da ingestão energética. Outras alterações metabólicas decorrentes destes comportamentos alimentares podem estar envolvidas e devem ser avaliadas.

Palavras-chave: fenômenos bioquímicos, metabolismo e nutrição; Conduta na alimentação; obesidade; ratos Wistar

INTRODUÇÃO

As doenças crônico-degenerativas, recentemente definidas como doenças não-transmissíveis, constituem em nosso país e no mundo um dos principais agravantes da saúde. O índice de mortalidade por doença cardiovascular no Brasil é de 820 óbitos por dia e 42% dos adultos brasileiros possuem hipercolesterolemia (SBC, 1999). No Brasil as prevalências de diabete melito são igualmente altas comparadas às de nações desenvolvidas (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

Hábitos da cultura moderna foram identificados como potenciais fatores de risco para tais doenças, tais como alimentação inadequada (KERWICK e PAWAN, 1966; SEIDELL, 1999; OMS, 1998), excesso de gordura corporal e obesidade (OMS, 1995; OMS, 1998), e sedentarismo (BLAIR *et al.*, 1996; DENGEL *et al.*, 1998; SEIDELL, 1999).

A obesidade é considerada uma epidemia mundial (POPKIN e DOAK, 1998). No Brasil, estudos comprovaram que a transição nos padrões nutricionais está refletindo na diminuição progressiva da desnutrição e no aumento da obesidade (MONTEIRO *et al.*, 1995b). A obesidade está associada à resistência à ação da insulina (ADA, 1997), e há uma síndrome clínica que resume essa interação: síndrome metabólica ou X (DEFRONZO e FERRANNINI, 1991; HANSEN, 1995).

A alimentação inadequada representa uma das maiores causas dessas desordens. As tendências de transição nutricional convergem para uma dieta mais rica em gorduras (particularmente as de origem animal), açúcares e alimentos refinados, sendo reduzida em carboidratos complexos e fibras, chamada “dieta ocidental” (MONTEIRO *et al.*, 1995a). Estudos realizados com mulheres obesas brasileiras por nosso grupo reforçam que este padrão de alimentação hiperlipídica e hipoglicídica esteja se repetindo em nosso país (FRANCISCHI *et al.*, 1997; FRANCISCHI *et al.*, 1999a; FRANCISCHI *et al.*, 1999b; KLOPFER *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 1998; FRANCISCHI *et al.*, 2001).

Classicamente já se sabe da relação entre ingestão lipídica e obesidade (AUSTRUP, 1999; LISSNER, 1999; SEIDELL, 1999) e entre consumo de gorduras e doenças cardiovasculares (HIGUERAS *et al.*, 1992; SBC, 1999), em especial às saturadas (LICHTENSTEIN *et al.*, 1998), mas um ponto de interesse é a relação com o diabete melito tipo 2 (MARSHALL *et al.*, 1991). Em ratos alimentados com excesso de gordura, já se observou desenvolvimento de obesidade (SEGUÉS *et al.*, 1994; GIANOTTI *et al.*, 1988; SCLAFANI e SPRINGER, 1976; STORLIEN *et al.*, 1986) e redução na ação insulínica sistêmica, muscular e em adipócitos (GRUNDLEGER e THENEN 1982; MILLER *et al.*, 1985; STORLIEN *et al.*, 1986; STORLIEN *et al.*, 1996; ROCCHINI *et al.*, 1997; HAN *et al.*, 1997; WILKES *et al.*, 1998; PAGLIASSOTTI *et al.*, 1997). Apesar de bem menos estudado, também já foram observadas alterações no pâncreas endócrino em consequência do consumo crônico de dietas hiperlipídicas, com prejuízo na produção e na secreção de insulina pela célula-beta (RUGGERI, 1999). Trabalhos em humanos demonstraram que ambas ingestão de gordura total e ingestão percentual de ácidos graxos saturados apresentaram correlações positivas com a insulinemia de jejum e pós-prandial, mesmo com os ajustes estatísticos para adiposidade (PARKER *et al.*, 1993). Essas correlações positivas foram atenuadas quando ajustadas estatisticamente para a presença

de sedentarismo (MAYER, 1993). O estudo da hiperinsulinemia é de grande interesse para a comunidade científica, uma vez que esta alteração hormonal aparenta ser a causa de inúmeras doenças metabólicas (DEFRONZO e FERRANNINI, 1991).

O comportamento alimentar também pode determinar alterações metabólicas, principalmente quando se considera a frequência de ingestão alimentar. Em estudos transversais, já foi demonstrado que o aumento nessa frequência está associado à diminuição nas concentrações plasmáticas de colesterol (EDELSTEIN *et al.*, 1992) e demais lipídios plasmáticos (MANN, 1997). Além disso, a frequência alimentar, excluindo-se os efeitos da ingestão calórica, parece estar inversamente relacionada com a adiposidade (METZNER, 1977). O padrão de ingestão copioso, com grandes volumes e baixo fracionamento, demonstrou aumentar a lipogênese (BRAY, 1972; FABRY *et al.*, 1964; KNITTLE, 1966) e o peso corporal (BRAY, 1972; DALOSSO *et al.*, 1982; LEVEILLE, 1972), apesar de não influenciar os gastos energéticos (BELLISLE *et al.*, 1997; LEVEILLE, 1972; VERBOEKET-VAN DE VENNE *et al.*, 1993). No entanto, autores defendem que o comportamento alimentar quanto à frequência de ingestão não pode ser considerado um dos maiores determinantes da obesidade (BELLISLE, 1997; SUMMERBELL *et al.*, 1995).

Na década de 30, ELLIS (1934) sugeriu que o aumento na frequência alimentar seria vantajoso na administração de insulina e glicose em casos de diabetes melito. Foram encontradas diferenças metabólicas significativas em homens que consumiam 3 (ou menos) refeições por dia ou 5 (ou mais): no primeiro grupo a presença de excesso de peso, hipercolesterolemia e tolerância à glicose diminuída foi muito maior (FABRY *et al.*, 1964). As baixas variações insulinêmicas parecem ser a proteção contra as alterações metabólicas lipídicas e de carboidratos numa dieta fracionada (JENKINS *et al.*, 1989; JENKINS *et al.*, 1992; JENKINS *et al.*, 1995; JENKINS *et al.*, 1997; WOLEVER, 1990), apesar de estudos em animais demonstrarem melhor tolerância à glicose em resposta à alimentação esporádica (LEVEILLE e CHAKRABARTY, 1968; ROMSOS e LEVEILLE, 1974). O modelo experimental com ratos vem sendo bastante utilizado para o estudo dos efeitos metabólicos dos comportamentos alimentares em relação à frequência alimentar. Sabe-se que os ratos são biologicamente animais com alto fracionamento da dieta (12,3 refeições por dia, segundo MILLER *et al.*, 1994), mas se adaptam rapidamente ao padrão copioso.

O estudo da frequência alimentar ainda requer trabalhos futuros. Apesar dos indicativos listados sobre os benefícios da ingestão fracionada, estudos em longo prazo não foram conduzidos. O maior intervalo de tempo estudado foi de 4 semanas, sendo que há estudos de apenas 1 dia. Curiosamente, a maior produção científica nesse assunto foi entre as décadas de 60 e 70. Além disso, a frequência alimentar reduzida aliada a dietas com composições inadequadas, como as hiperlipídicas, foram pouco estudadas. Tal associação reflete um hábito do estilo de vida moderno e parece repercutir significativamente sobre desvios metabólicos de grande relevância para a saúde pública do país. Assim sendo, o presente trabalho objetivou combinar frequência alimentar e dietas hiperlipídicas cronicamente e avaliar respostas metabólicas quanto à tolerância à glicose e acúmulo de gordura corporal, conforme descrito a seguir.

OBJETIVOS

Comparar a ingestão alimentar, o ganho de peso, a composição corporal quanto ao conteúdo de gordura e o desenvolvimento de intolerância à glicose em ratas submetidas cronicamente a dietas hiperlipídicas ou hipolipídicas associadas ou não ao comportamento alimentar com frequência reduzida de ingestão alimentar;

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Protocolo Experimental: A amostra dos experimentos foi composta de ratas fêmeas Wistar, uma vez que ratas fêmeas apresentam maior eficiência lipogênica em relação aos ratos machos (SCLAFANI, 1992), sabendo que as variações no ciclo estral seriam minimizadas pelo longo tempo de intervenção (8 semanas). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicado à Atividade Motora da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, com ciclo claro escuro invertido, com livre acesso à água e ração comercial (Labina, Ralston Purina do Brasil, São Paulo/SP). O experimento teve início quando os animais atingiram a idade adulta, sendo então mantidos nas mesmas condições, porém em gaiolas individuais e divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais que diferenciaram quanto à composição da dieta e a frequência de ingestão alimentar, conforme descrito no quadro 1.

O experimento teve duração de 8 semanas e cada grupo foi composto de cinco animais. Os animais dos grupos C24h e HL24h tiveram livre acesso às suas dietas e os animais dos grupos C2h e HL2h tiveram acesso às suas respectivas dietas apenas 1 vez ao dia, durante duas horas seguidas, das 12:00 às 14:00. A ração consumida pelos grupos controle foi comercial, semelhante à consumida na fase de crescimento dos animais. A formulação da dieta hiperlipídica foi realizada no Laboratório de Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde também se procedeu a análise bromatológica desta, revelando a seguinte composição por 100g:

- Ração comercial: 55,2% de carboidratos e fibras; 22,7% de proteínas; 4,2% de lipídios.
- Hiperlipídica: 52,6% de carboidratos e fibras; 20,4% de proteínas; 20,5% de lipídios.

A principal fonte de gorduras utilizada foi a banha de porco, a qual sabidamente possui elevada quantidade de ácidos graxos saturados. A composição desta ração hiperlipídica reproduziu o padrão de alimentação da dieta ocidental já observado anteriormente em nossos estudos com mulheres obesas brasileiras (FRANCISCHI *et al* 1999b). A fonte de proteínas utilizada na formulação da ração hiperlipídica foi a caseína e a de carboidratos foi o amido de milho. Para garantir aporte de vitaminas, foram adicionados 10g/kg de suplemento vitamínico para animal de laboratório (*Rboster*, Vargem Grande Paulista/SP).

Houve acompanhamento diário do crescimento ponderal dos animais e das quantidades de ração consumidas por cada animal. Decorrida a intervenção dietética, os animais foram sacrificados por concussão cerebral após 4 horas de privação alimentar, com apenas água à disposição.

Métodos analíticos: Para a estimativa da captação de glicose sistemicamente, foram realizados testes de tolerância oral à glicose (OGTT) em cada animal cinco dias antes do sacrifício com metodologia descrita anteriormente (ISHIDA *et al*, 1996). Após o sacrifício, foram dissecados e pesados os tecidos adiposos marrom e branco (retroperitoneal e corpo adiposo), fígado e amostras de músculo esquelético com fibras do tipo vermelha (sóleo) e mista (gastrocnêmio). Foram calculados os seus respectivos pesos relativos ao peso corporal e os tecidos foram utilizados para determinação do conteúdo lipídico total segundo metodologia descrita (STANSBIE *et al.*, 1976). Toda a carcaça restante também foi separada e homogeneizada para determinação do conteúdo lipídico segundo a mesma metodologia.

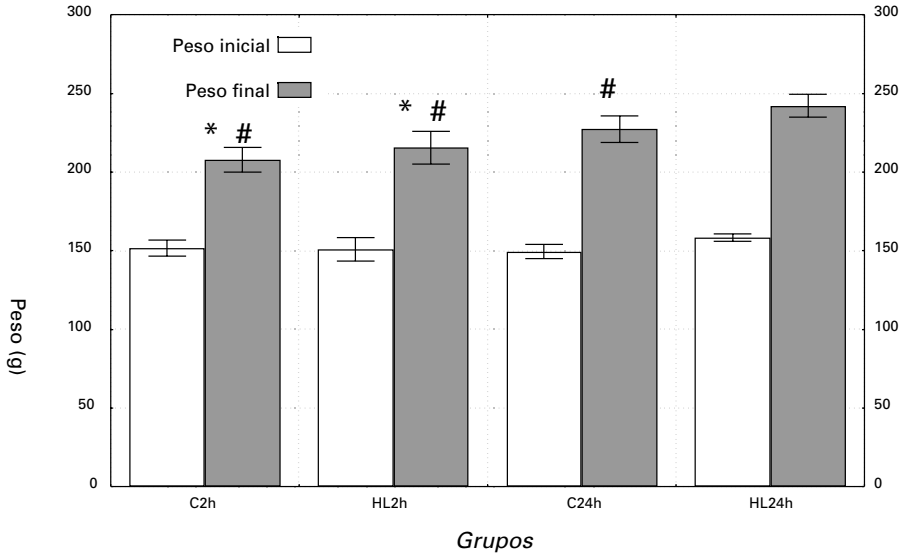
Análise dos dados: Objetivando comparar as médias entre os 4 experimentais e testar a significância das diferenças entre elas, foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) e testes *a posteriori* (post-hoc LSD-planned comparison). O número de repetições testadas dependeu do número de animais utilizados para cada parâmetro avaliado, sendo informado em cada tabela ou figura o n de cada grupo. Todas as análises estatísticas foram efetuadas com o software STATISTICA for Windows versão 5.0 (StatísticaStatSoft, Inc. (1995). [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2325 East 13th Street, Tulsa, OK 74104). O nível de significância foi determinado em $p < 0,05$.

RESULTADOS

O figura 1 ilustra a variação no peso corporal no início e após as 8 semanas de intervenção dietética em cada grupo experimental. O grupo HL24h apresentou o maior peso corporal, sendo que ambos grupos com baixo fracionamento atingiram o mesmo peso, inferior aos animais com alimentação “ad libitum”.

Interessante é comparar esse resultado com as médias de consumo alimentar, tanto para os valores de peso de ração ingerida (g/dia) como para o consumo energético (kcal/dia) apresentados no figura 2. Em gramas, os grupos com dieta hiperlipídica ingeriram menos ração. No entanto, ao calcular esses valores de acordo com a densidade energética ingerida (kcal/dia), essas diferenças desapareceram, permanecendo apenas as diferenças no tocante à frequência de ingestão: os grupos com apenas 2h de acesso ao alimento ingeriram menos calorias que os animais com livre acesso. Estas diferenças mantiveram-se semelhantes quando corrigidas pelo peso corporal (dados não apresentados).

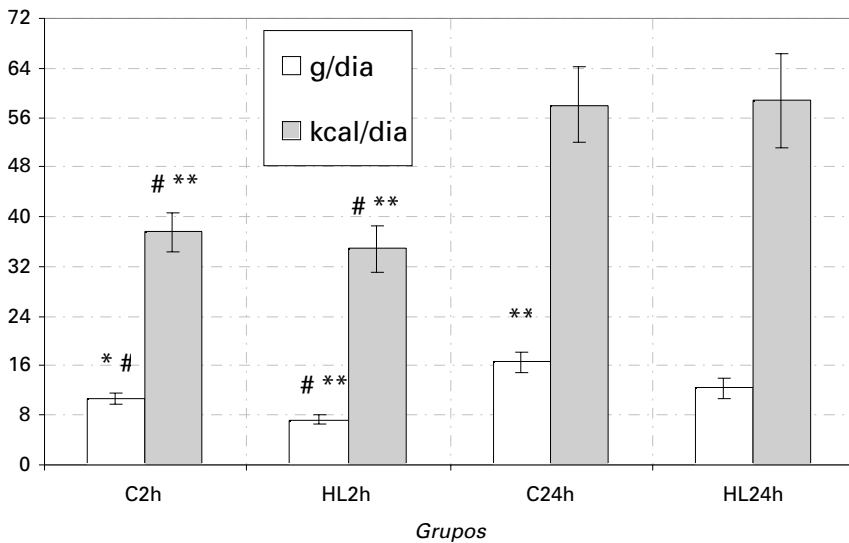
A tabela 2 apresenta os pesos de cada tecido dissecado relativos ao peso corporal final. Pode-se notar que o fígado dos animais controle foi maior do que os que consumiram dieta hiperlipídica. Os resultados dos músculos esqueléticos (sóleo e gastrocnêmio) demonstraram pesos semelhantes em todos os grupos. Tanto o tecido adiposo



&: C2h: controle intermitente (n=5); HL2h: hiperlipídica intermitente (n=5); C24h: controle fracionado (n=5); HL24h: hiperlipídica fracionada (n=5).

*: p<0,01 em relação ao peso final de C24h
#: p<0,01 em relação ao peso final de HL24h

Figura 1 Peso corporal (g; média ± erro-padrão) no início e ao final do experimento em cada grupo experimental&



: C2h: controle intermitente (n=5); HL2h: hiperlipídica intermitente (n=5); C24h: controle fracionado (n=5); HL24h: hiperlipídica fracionada (n=5).

* = p<0,01 em relação ao grupo HL2h para a mesma variável
: p<0,01 em relação ao grupo C24h para a mesma variável
** : p<0,01 em relação ao grupo HL24h para a mesma variável

Figura 2 Consumo alimentar (g/dia; kcal/dia; média ± desvio-padrão) em cada grupo experimental&

retroperitoneal (TARP), o corpo adiposo (CA) e o tecido adiposo marrom (TAM) foram maiores no HL24h. Comparando entre os grupos com apenas 2h diárias de alimentação, observa-se que a alimentação hiperlipídica garantiu TARP, CA e TAM cerca de duas vezes maiores do que no controle. Nos animais com alto fracionamento da dieta (24h), essa diferença em função da alimentação hiperlipídica foi cerca de três vezes, com exceção do TAM, que se apresentou semelhante entre os grupos HL2h e HL24h e entre os grupos C2h e C24H, sendo maior nos grupos com dieta hiperlipídica.

Tabela 1 Composição da dieta e sua frequência de ingestão segundo grupo experimental

Grupos	Composição da dieta	Frequência de ingestão alimentar
CONTROLE 24 HORAS	Hipolipídica (ração comercial)	Ad libitum - (C24H)
HIPERLIPÍDICA 24 HORAS	Hiperlipídica	Ad libitum - (HL24H)
CONTROLE 2 HORAS	Hipolipídica (ração comercial)	1 vez/dia - (C2h)
HIPERLIPÍDICA 2 HORAS	Hiperlipídica	1 vez/dia - (HL2h)

Tabela 2 Peso (média \pm desvio-padrão) dos tecidos dissecados (fígado, músculos sóleos, músculos gastrocnêmios, tecido adiposo retroperitoneal (TARP), corpo adiposo (CA) e tecido adiposo marrom (TAM)) relativos ao peso corporal anterior ao sacrifício (mg de tecido/g peso corporal) em cada grupo experimental[&]:

Grupos ^{&}		Fígado (mg/g)	Sóleo (mg/g)	Gastro (mg/g)	TARP (mg/g)	CA (mg/g)	TAM (mg/g)
C2h (n=5)	Média	31,63 [*]	0,79	12,52	6,46 ^{*#}	7,36 ^{*#}	1,09 ^{**#}
	Desvio padrão	2,51	0,11	0,52	1,75	5,16	0,39
HL2h (n=5)	Média	28,86	0,77	12,67	15,99 [*]	15,33 [*]	2,01 ^{##}
	Desvio padrão	4,29	0,07	1,17	5,23	4,11	0,59
C24h (n=5)	Média	30,90 [*]	0,77	12,19	10,26 [*]	11,72 [*]	1,27 ^{**}
	Desvio padrão	2,00	0,13	0,46	3,34	2,34	0,30
HL24h (n=5)	Média	25,17	0,78	11,67	30,24	30,21	1,99
	Desvio padrão	1,77	0,07	0,66	9,85	7,26	0,23

&: C2h: controle intermitente (n=5); HL2h: hiperlipídica intermitente (n=5); C24h: controle fracionado (n=5); HL24h: hiperlipídica fracionada (n=5).

* : p < 0.01 em relação ao grupo HL24h

** : p < 0.05 em relação ao grupo HL24h

: p < 0.05 em relação ao grupo HL2h

: p < 0.05 em relação ao grupo C24h

Tabela 3 Glicemia (mg/dL; média \pm desvio-padrão) a cada 30 minutos do teste oral de tolerância à glicose em cada grupo experimental[&] ao final do experimento

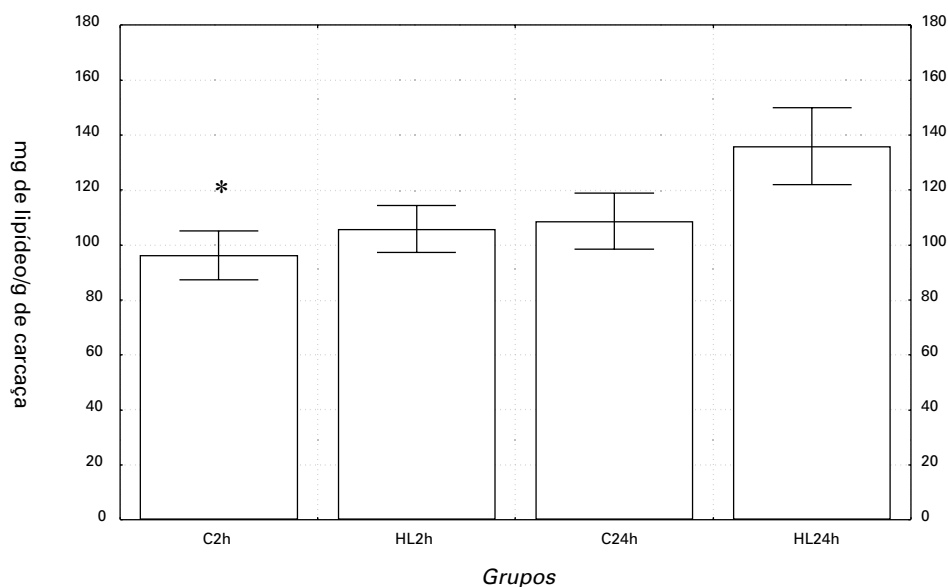
Grupos		minutos				
		0	30	60	90	120
C2h	Média	65,4	89,4 ^{*,**,*}	87,8	75,0 ^{*,**,*}	64,4 ^{*,**,*}
	desvio-padrão	6,1	6,1	18,8	6,0	6,2
HL2h	Média	75,2 ^{*,**,*}	117,0	90,2	82,4 ^{**}	78,4 ^{**}
	desvio-padrão	12,5	18,0	12,6	7,9	5,2
C24h	Média	57,2	130,8	80,8	63,6 ^{***}	60,8 ^{***}
	desvio-padrão	7,7	10,8	18,0	19,2	8,7
HL24h	Média	61,0	114,3	94,5	86,3	82,0
	desvio-padrão	2,2	16,9	7,3	8,1	6,5

&: C2h: controle intermitente (n=5); HL2h: hiperlipídica intermitente (n=5); C24h: controle fracionado (n=5); HL24h: hiperlipídica fracionada (n=5).

*: p<0,05 em relação ao HL2h para o mesmo intervalo de tempo;

** : p<0,05 em relação ao C24h para o mesmo intervalo de tempo;

***: p<0,05 em relação ao HL24h para o mesmo intervalo de tempo;



[&]: C2h: controle intermitente (n=5); HL2h: hiperlipídica intermitente (n=5); C24h: controle fracionado (n=5); HL24h: hiperlipídica fracionada (n=5).

* : p < 0,05 em relação ao grupo HL24h

Figura 3 Conteúdo (média \pm erro-padrão) de gorduras extraídas das carcaças (mg gordura/g carcaça) dos animais em cada grupo experimental[&]

A quantidade de lipídios incorporados na carcaça dos animais HL2h foi semelhante a dos grupos C24h e HL24h (figura 3). Apenas o grupo C2h teve essa incorporação menor quando comparada ao grupo HL24h. Considerando a incorporação lipídica nos tecidos adiposos (gráfico 4), nota-se que HL2h apresentou o mesmo teor no corpo adiposo que os grupos HL24h e C24h, significativamente maior que o grupo C2h. Quanto à incorporação de gorduras no tecido adiposo retro-peritoneal (figura 4), mais uma vez observou-se maior acúmulo de gordura nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, sendo que HL2h apresentou grande eficiência para incorporação de gordura, semelhante a HL24h.

A tabela 3 apresenta os valores de glicemias obtidos durante o teste de tolerância oral à glicose. Pode-se notar nítida melhora na tolerância à glicose nos animais alimentados esporadicamente (2h) (minutos 30, 90 e 120). Além disso, percebe-se que os animais com ingestão hiperlipídica apresentaram valores glicêmicos mais altos que os animais controle, revelando piora na tolerância (minutos 90 e 120). Com exceção da glicemia no minuto 0, as curvas entre os grupos HL2h e HL24h foram semelhantes. Ressalta-se que a maior concentração glicêmica no minuto 0 foi no grupo HL2h.

DISCUSSÃO

Este trabalho objetivou avaliar a frequência de ingestão alimentar aliada à dieta hiperlipídica no desenvolvimento de obesidade e de intolerância à glicose em ratas. Ao contrário do esperado, em que a baixa frequência de ingestão levaria ao aumento de peso corporal (BRAY, 1972; DALOSSO *et al.*, 1982; FABRY e TEPPERMAN, 1970; LEVEILLE e HANSON, 1965), ao final das 8 semanas de intervenção a baixa frequência de ingestão determinou menores pesos corporais do que a ingestão “ad libitum”. No entanto, quando o consumo alimentar de animais com baixo fracionamento da dieta foi inferior ao observado em animais “ad libitum”, outros autores também notaram menor ganho de peso em função da alimentação intermitente (BELDA, 1987a; BELDA, 1987b; ROMSOS e LEVEILLE, 1974; STEVENSON *et al.*, 1964). Assim, os resultados obtidos em nosso experimento quanto à ingestão alimentar justificam o menor peso corporal em animais com apenas 2h diárias de acesso ao alimento, que ingeriram consideravelmente menos alimento por dia. De fato, quando camundongos submetidos à alimentação esporádica alimentaram-se com quantidades isocalóricas a animais com livre acesso ao alimento, os primeiros apresentaram maior ganho de peso e acúmulo de gordura (KERWICK e PAWAN, 1966).

O menor consumo alimentar nos animais com baixo fracionamento da dieta justifica-se pelo curto intervalo de tempo em que houve alimento à disposição (apenas 2 horas por dia), insuficiente para atingir a ingestão nos animais com oferta “ad libitum”. Quanto à composição da dieta, notou-se menor consumo (em g/dia) nos animais com ração hiperlipídica, em relação aos seus respectivos controles para a frequência de ingestão. Isso ocorreu em virtude da diferença na densidade energética de cada ração (comercial: 350 kcal/100g; hiperlipídica: 476 kcal/100g), sendo que os dois grupos “24h” e os dois grupos “2h” iguallaram entre si os respectivos consumos energéticos (em

kcal/dia). Esta capacidade de regular a ingestão calórica é um fino ajuste no balanço energético que ratos Wistar possuem biologicamente.

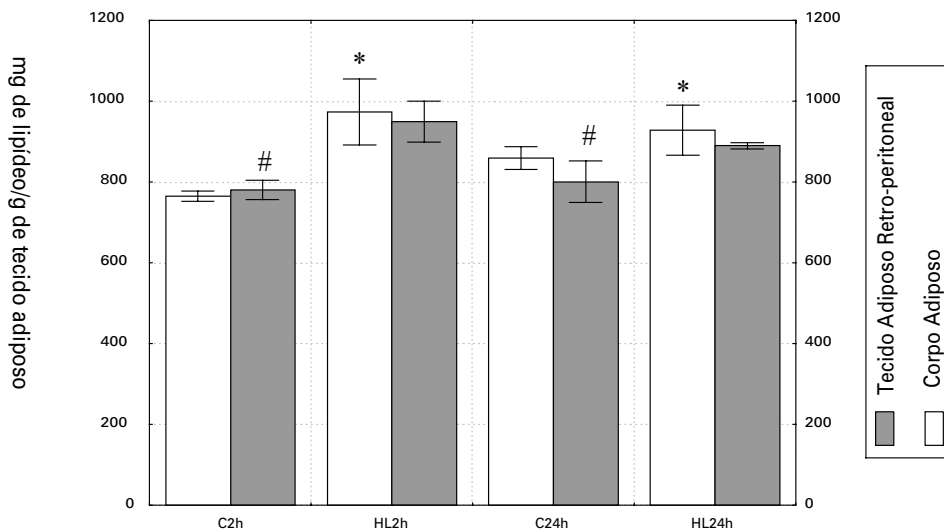
As diferenças no consumo alimentar garantiram diferentes composições corporais nos animais. O fígado, com peso relativo maior nos animais controle, pode ter um menor teor de glicogênio (e conseqüentemente de água) nos animais com dieta hiperlipídica, já que as reservas deste substrato são diretamente proporcionais ao conteúdo de carboidratos da alimentação (BERGSTROM *et al.*, 1967). Os resultados dos músculos esqueléticos (sóleo e gastrocnêmio) demonstraram que, mesmo em função de considerável restrição no consumo alimentar, os animais com alimentação intermitente mantiveram a integridade da massa muscular.

O padrão mais interessante observado nestes animais refere-se aos tecidos adiposos, que foram maiores no grupo HL24h. Comparando com seu controle (C24h), com a mesma ingestão energética e com apenas diferenças no teor lipídico, notou-se que o fator limitante no estoque de gordura corporal não foi o conteúdo energético, e sim o de lipídios. Entre os grupos com alimentação esporádica, também se observou que a alimentação hiperlipídica (HL2h) garantiu estoques de tecido adiposo maiores do que no controle (C2h), revelando que mesmo frente a um consumo energético extremamente reduzido, os animais com a alimentação hiperlipídica infrequente (HL2h) conseguiram estocar gordura corporal na mesma proporção que os animais C24h, sendo que o TAM do grupo HL2h foi praticamente idêntico ao do grupo HL24h (com ingestão muito maior).

Além disso, a quantidade de lipídios incorporada na carcaça dos animais HL2h foi estatisticamente semelhante ao grupo C24h e HL24h. Considerando a incorporação lipídica no corpo adiposo, também se observou que HL2h apresentou o mesmo teor que os grupos C24h e HL24h, significativamente maior que o grupo C2h. Aliás, como visto anteriormente, este último, o grupo C2h, apresentou a mesma ingestão energética média que o grupo HL2h. A incorporação lipídica no TARP também revelou eficiência no estoque em animais com dieta hiperlipídica, sendo que a combinação desta com a baixa frequência de ingestão (HL2h) garantiu reservas de gordura corporais semelhantes ao HL24h, que possuíram uma ingestão energética 62% maior que HL2h. Concluí-se assim que o grupo HL2h teve uma grande eficiência em estocar os lipídios da dieta na forma de gordura corporal.

A literatura claramente traz informações sobre a eficiência da lipogênese em função de uma alimentação copiosa ou da ingestão hiperlipídica. Referindo-se primeiramente ao componente hiperlipídico, é extremamente importante o balanço de gorduras no organismo, e não apenas o balanço energético, e nossos dados reforçam esse conceito. Não só os totais de energia ingerida e gasta regulam a quantidade dos estoques corporais (FLATT, 1987; FLATT, 1995; MELBY *et al.*, 1998; PRENTICE, 1998; SWINBURN e RAVUSSIN, 1993; TREMBLAY *et al.*, 1994). O balanço de cada macronutriente parece possuir um rigoroso controle para ajustar seu consumo com sua oxidação (e vice-versa) e manter um estado de equilíbrio: o balanço de nitrogênio e de carboidratos é facilitado

pela capacidade do organismo em ajustar as taxas de oxidação de aminoácidos e de glicose, respectivamente, em relação aos seus consumos alimentares (FLATT, 1987). No caso das gorduras, esse ajuste é bem menos preciso e o aumento no seu consumo não estimula a sua oxidação. Então, o organismo aumenta os estoques de gordura corporal (FLATT, 1987).



∆: C2h: controle intermitente (n=5); HL2h: hiperlipídica intermitente (n=5); C24h: controle fracionado (n=5); HL24h: hiperlipídica fracionada (n=5).

* : p < 0,05 em relação ao grupo C2h para a mesma variável

: p < 0,05 em relação ao grupo HL24h para a mesma variável

Figura 4 Conteúdo (média + erro-padrão) de gorduras extraídas dos tecidos adiposos (corpo adiposo e tecido adiposo retro-peritoneal) (mg gordura/g carcaça) dos animais em cada grupo experimental[∆]:

Dietas hiperlipídicas já comprovadamente levaram ao excesso de gordura corporal em macacos, cães, suínos, esquilos, hamsters e ratos (WEST e YORK, 1991), com ou sem associação de hiperfagia. Os efeitos metabólicos responsáveis por este quadro podem estar relacionados aos desvios metabólicos que levariam à intolerância à glicose em consequência do excesso de peso e da alimentação rica em lipídios, que são caracterizados pelos prejuízos na ação e na secreção da insulina cronicamente.

Discutindo o papel da frequência de ingestão alimentar sobre a lipogênese, nossos dados estão de acordo com o já observado na literatura (BRAY, 1972; DALOSSO *et al.*, 1982; FABRY *et al.*, 1964; KNITTLE, 1966; LEVEILLE, 1972). Os mecanismos que o consumo intermitente poderia induzir para garantir essa eficiência energética consideram a hipertrofia intestinal e maior absorção de glicose; aumento na atividade da maquinaria enzimática responsável pela lipogênese e pelos processos anabólicos em geral (FABRY e TEPPERMAN, 1970; LEVEILLE, 1972), considerando também o aumento na insulinemia e aumento na sensibilidade à insulina no tecido adiposo (FABRY e TEPPERMAN, 1970).

Nossos dados apontam melhora na tolerância à glicose nos animais alimentados com baixa frequência de ingestão e piora nos animais com ingestão hiperlipídica, embora a maior glicemia de jejum tenha sido observada em HL2h. Enquanto a alimentação rica em gorduras predispõe tanto indivíduos como animais ao diabetes melito (GRUNDLEGER e THENEN 1982; MAYER *et al.*, 1993; MILLER *et al.*, 1985; STORLIEN *et al.*, 1986; STORLIEN *et al.*, 1996; ROCCHINI *et al.*, 1997; HAN *et al.*, 1997; WILKES *et al.*, 1998; PAGLIASSOTTI *et al.*, 1997; PARKER *et al.*, 1993; RUGGERI, 1999), a alimentação infrequente parece causar prejuízos para as respostas insulinêmicas e o metabolismo em geral apenas em humanos (JENKINS *et al.*, 1989; JENKINS *et al.*, 1992; JENKINS *et al.*, 1995; JENKINS *et al.*, 1997; WOLEVER, 1990), já que em animais essa mesma alimentação parece ser benéfica para o metabolismo de carboidratos (FABRY e TEPPERMAN, 1970; LEVEILLE e CHAKRABARTY, 1968; ROMSOS e LEVEILLE, 1974).

As possíveis explicações dos autores para essa melhora na tolerância à glicose recaem sobre a insulinemia: a maior concentração de insulina nos animais com alimentação intermitente e a maior sensibilidade do tecido adiposo a esta, mesmo em função da maior absorção intestinal de glicose, garantem melhor tolerância à glicose e maior susceptibilidade a lipogênese (ROMSOS e LEVEILLE, 1974). Uma hipótese a ser discutida quanto à melhora na tolerância à glicose em animais com baixo fracionamento da dieta é que ainda não houve tempo suficiente para o desenvolvimento da síndrome metabólica nestes animais, uma vez que há grandes chances de que estas altas concentrações insulinêmicas levem cronicamente à falência da célula-beta e à resistência à insulina. Defeitos na secreção de insulina têm sido recentemente ressaltados como de suma importância para o desenvolvimento da intolerância à glicose: atualmente acredita-se que, para o desenvolvimento completo do diabetes melito, ambos defeitos na secreção e na ação da insulina devam ocorrer simultaneamente (DEFRONZO, 1997), já que mesmo em presença de resistência à insulina o pâncreas pode super compensar este defeito. A hiperglicemia somente se manifesta a partir do momento em que o pâncreas não é mais capaz de sustentar as altas taxas secretórias de insulina, levando a falência da célula beta (DEFRONZO, 1997).

Assim, considerando as fases de desenvolvimento do diabetes melito, parece que estes animais com alimentação intermitente ainda estão no estágio inicial, e um estudo mais prolongado pode observar o início da intolerância à glicose, que é observado em humanos com baixa frequência de ingestão alimentar. O trabalho de CURI e HELL (1986), comparando as adaptações metabólicas após 4 semanas e após 20 semanas em ratos divididos em livre acesso ao alimento ou com apenas 2h de acesso diário à ração revelou que, após 4 semanas, a glicemia entre os grupos ainda não foi estatisticamente diferente, porém após 20 semanas de consumo intermitente, os animais com apenas 2h de acesso ao alimento apresentaram glicemia de jejum 26,7% maior. De fato, um estudo original (SANTOS *et al.*, 1989) sobre as respostas do pâncreas endócrino em função de diferentes comportamentos alimentares revelou que a baixa frequência de ingestão prejudica a função normal da célula-beta.

Estudos futuros específicos das alterações na sensibilidade periférica à insulina e do funcionamento pancreático serão importantes para melhor caracterizar a evolução de distúrbios metabólicos em resposta a estes comportamentos alimentares. Além disso, estudos com ingestão alimentar pareada entre os grupos com diferentes frequências de ingestão alimentar também serão necessários para melhor elucidar a eficiência energética conseqüente das alterações na frequência de ingestão e na composição da dieta.

CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que os maiores estoques de gordura corporal foram mais dependentes do alto teor lipídico da dieta e da baixa frequência alimentar do que da ingestão energética. A tolerância à glicose apresentou-se prejudicada em resposta à alimentação hiperlipídica crônica, mas estes resultados em conseqüência da frequência alimentar ainda não são conclusivos. Assim, percebe-se que alterações metabólicas decorrentes destes comportamentos alimentares, bastante presentes no hábito moderno, podem estar envolvidas e devem ser avaliadas em estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- ADA-AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of *diabetes mellitus*. *Diabetes care*. New York, v.20, p.1183-97, 1997.
- AUSTRUP, A. Dietary fat and obesity – Does quantity matter? *Scand. J. Nutrition*. Lund, v.43, n.34, p.28S, 1999.
- BELDA, M.C.R.; ZUCAS, S.M.; CURY, P.R. Efeitos da frequência da ingestão de alimentos e do exercício físico sobre a composição corporal: níveis de lipídios e proteínas nas carcaças de ratos *Rev. Cienc. Farm.* Araraquara, v.8/9, p.183-97, 1987b.
- BELDA, M.C.R.; ZUCAS, S.M.; CURY, P.R. Efeitos da frequência da ingestão de alimentos e do exercício físico sobre o crescimento de ratos. *Rev. Cienc. Farm.* Araraquara, v.8/9, p.25-49, 1987a.
- BELLISLE, F.; McDEVITT, R.; PRENTICE, A.M. Meal frequency and energy balance. *Br. J. Nutr.* Cambridge, v.77, n.1, p.S57-S70, 1997.
- BERGSTROM, J.; HERMANSEN, L.; HULTMAN, E.; SALTIN, B. Diet muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol. Scand.* Stockholm, v.71, p.140, 1967.
- BLAIR, S.N.; HORTON, E.; LEON, A.S.; LEE, I-MIN; DRINKWATER, B.L.; DISHMAN, R.K.; MACKEY, M.; KIENHOLZ, M.L. Physical activity, nutrition and chronic disease. *Med. Sci. Sports Exerc.* Baltimore, v.28, p.335-49, 1996.
- BRAY, G.A. Lipogenesis in human adipose tissue: some effects of nibbling and gorging. *J. Clin. Invest.* New Haven, v.51, p.537-48, 1972.
- CURI, R.; HELL, S. Metabolic changes of twenty weeks food-restriction schedule in rats. *Physiol. Behav.* New York, v.36, p.239-43, 1986.
- DALOSSO, H.M.; NURGATROYD, P.R.; JAMES, W.P.T. Feeding frequency and energy balance in adult males. *Human Nutrition: Clinical Nutrition*. London, v.36c, p.25-39, 1982.
- DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* New York, v.5, p.177-267, 1997.

- DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes care*, New York, v.14, p.173-94, 1991.
- DENGEL, D.R.; HAGBERG, J.M.; PRATLEY, R.E.; ROGUS, E.M.; GOLDBERG, A. P. Improvements in blood pressure, glucose metabolism, and lipoprotein lipids after aerobic exercise plus weight loss in obese, hypertensive middle-aged men. *Metabolism*. London, v.47, p.1075-1082, 1998.
- EDELSTEIN, S.L.; BARRETT-CONNOR, E.L.; WINGARD, D.L.; COHN, B.A. Increased meal frequency associated with decreased cholesterol concentration; Rancho Bernardo, CA, 1984-1987. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.55, p.664-9, 1992.
- ELLIS, A. Increased carbohydrate tolerance in diabetes following hourly administration of glucose and insulin over long periods. *Quart. J. Med.* Oxford, v.27, p.137-53, 1934.
- FABRY, P. *Feeding pattern and nutritional adaptations*. London: Butterworths, 1969.
- FABRY, P.; HEJL, Z.; FODOR, J.; BRAUN, T. The frequency of meals – its relation to overweight, hypercholesterolemia, and decrease glucose tolerance. *Lancet*, London, v.19, p.614-5, 1964.
- FABRY, P.; TEPPERMAN, J. Meal frequency – a possible factor in human pathology. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.23, p.1059-68, 1970.
- FLATT, J.P. Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance: effects of exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.45, p.296-306, 1987.
- FLATT, J.P. Use and storage of carbohydrate and fat. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.61, p.952S-9S, 1995.
- FRANCISCHI, R.P.; KLOPFER, M.; PEREIRA, L.O.; CAMPOS, P.L.; SAWADA, L. A.; SANTOS, R.; VIEIRA, P.; LANCHÁ JR, A. H. Efeito da intensidade da atividade física e da dieta hipocalórica sobre consumo alimentar, a composição corporal e a colesterolemia em mulheres obesas. *Rev. Bras. Nutr. Clin.* Porto Alegre, v.14, p.1-8, 1999a.
- FRANCISCHI, R.P.; OQUENDO, L.; CAMPOS, P.L., FUTIGAMI, S., NETO, S.R.C., LANCHÁ JR, A.H. Physical activity and nutritional control features a treatment of obesity in Brazilian women. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF BIOCHEMISTRY OF EXERCISE 10th, Sydney, 1997. *Poster Abstracts*, Sydney, 1997, p.40.
- FRANCISCHI, R.P.; PEREIRA, L.O.; LANCHÁ Jr., A.H. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. *Rev. Paul. Educ. Fís.* São Paulo, v.15, n.2, p.117-40, 2001.
- FRANCISCHI, R.P.; SANTOS, R.C.; VIEIRA, P.; FREITAS, C.S.; KLOPFER, M. PEREIRA, L.O.; SAWADA, L.A.; CAMPOS, P.L.; LANCHÁ Jr., A. H. Effects of exercise on dietary composition, metabolism and body composition of Brazilian obese women. *Scand. J. Nutrition*. Lund, v.43, n.34, p.40S, 1999b.
- GIANOTTI, M.; ROCA, P.; PALOU, A. Body weight and tissue composition in rats made obese by a cafeteria diet. Effect of 24 hour starvation. *Horm. Metab. Res.* Stuttgart, v.20, p.208-12, 1988.
- GRUNDLEGER, M.L.; THENEN, S.W. Decreased insulin binding, glucose transport, and glucose metabolism in soleus muscle of rats fed a high fat diet. *Diabetes*. New York, v.31, p.232-7, 1982.
- HAN, D.; HANSEN, P.A.; HOST, H.H.; HOLLOSZY, J.O. Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. *Diabetes*. New York, v.46, p.1761-7, 1997.
- HANSEN, B.C. Obesity, diabetes, and insulin resistance: implications from molecular biology, epidemiology, and experimental studies in human and animals. *Diabetes care*. New York, v.18, n.2, p.A2-A9, 1995.
- HIGUERAS, J.M.; ARIAS, J.M.; MATAIX, F.J.; MONTELLANO, M.A.; LLOPIS, J. Plasma lipid composition in an elderly population: correlation with dietary fat. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* Berne, v.62, p.261-5, 1992.

- ISHIDA, K.; MIZUNO, A.; MURAKAMI, T.; SHIMA, K. Obesity is necessary but not sufficient for the development of diabetes mellitus. *Metabolism*. London, v.45, p.1288-95, 1996.
- JENKINS, D.J.A. Carbohydrate tolerance and food frequency. *Br. J. Nutr.* Cambridge, v.77, n.1, p.S71-S81, 1997.
- JENKINS, D.J.A.; KHAN, A.; JENKINS, A.L.; ILLINGWORTH, R.; PAPPU, A.S.; WOLEVER, T.M.S.; VUKSAN, V.; BUCKLEY, G.; RAO, A.V.; CUNNANE, S.C. Effect of nibbling versus gorging on cardiovascular risk factors: serum uric acid and blood lipids. *Metabolism*. London, v.44, p.549-55, 1995.
- JENKINS, D.J.A.; OCANA, A.; JENKINS, A.L.; WOLEVER, T.M.S.; VUKSAN, V.; KATZMAN, L.; HOLLANDS, M.; GREENBERG, G.; COREY, P.; PATTEN, R. Metabolic advantages of spreading the nutrient load: effects of increased meal frequency in non-insulin-dependent diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.55, p.461-7, 1992.
- JENKINS, D.J.A.; WOLEVER, T.M.S.; VUKSAN, V.; BRIGHENTI, F.; CUNNANE, S.C.; RAO, A.V.; JENKINS, A.L.; BUCKLEY, G.; PATTEN, R.; SINGER, W. Nibbling versus gorging: metabolic advantages of increased meal frequency. *N. Engl. J. Med.* Waltham Massachusetts, v.321, p.929-34, 1989.
- KERWICK, A.; PAWAN, G.L.S. The effect of feeding patterns on fat deposition in mice. *Metabolism*. London, v.15, p.173-80, 1966.
- KNITTLE, L. Meal-eating versus nibbling: effect on human adipose tissue metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.18, p.310, 1966.
- KLOPFER, M.; FRANCISCHI, R.; CAMARGO, R.; VIEIRA, P.; OQUENDO, L.; FREITAS, C.S.; SAWADA, L.; CAMPOS, P.; LANCHÁ JR., A.H. Moderate energy restriction with or without aerobic exercise: a comparison of three methods. In: DIET AND THE METABOLIC SYNDROME – INTERNATIONAL SYMPOSIUM; Ystad (Sweden), 1999. Ystad: Swedish Nutrition Foundation; 1999, p.65.
- LEVEILLE, G.A. Lipogenic adaptations related to pattern of food intake. *Nutr. Rev.* Washington DC, v.30, p.151-5, 1972.
- LEVEILLE, G.A.; CHAKRABARTY. Absorption and utilization of glucose by meal-fed and nibbling rats. *J. Nutrition*. Bethesda, v.96, p.69-75, 1968.
- LEVEILLE, G.A.; HANSON, R.W. Influence of periodicity of eating in the chicken. *J. Physiol.* London, v.209, p.153-7, 1965.
- LICHTENSTEIN, A.H.; KENNEDY, E.; BARRIER, P.; DANFORD, D.; ERNST, N.D.; GRUNDY, S.M.; LEVEILLE, G.A.; HORN, L.V.; WILLIAMS, C.L.; BOOTH, S.L. Dietary fat consumption and health. *Nutr. Rev.* Washington, DC, v.56, n.5 Pt II, p.S3-28, 1998.
- LISSNER, L. Dietary fat and prevention of obesity. *Scand. J. Nutrition*. Lund, v.43, n.34, p.18S, 1999.
- MANN, J. Meal frequency and plasma lipids and lipoproteins. *Br. J. Nutr.* Cambridge, v.77, n.1, p.S83-S90, 1997.
- MARSHALL, J.A.; HAMMAN, R.F.; BAXTER, J. High-fat, low-carbohydrate diet and the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus: The San Luis Valley diabetes study. *Am. J. Epidemiol.* Baltimore, v.134, p.590-603, 1991.
- MAYER, E.J.; WEISS, S.T.; TROISI, R.; CASSANO, P.A.; VOKONAS, P.S.; LANDSBERG, L. Usual dietary fat intake and insulin concentration in healthy women twins. *Diabetes Care*, New York, v.16, p.1459-69, 1993.
- MELBY, C.L.; COMMERFORD, S.R.; HILL, J.O. Exercise, macronutrient balance, and weight control. In: LAMB, D. R. & MURRAY, R. *Perspectives in Exercise Science and Sports Medicine volume 11: Exercise, Nutrition, and Weight Control*. Carmel: Cooper Publishing Group, 1998. p.1-60.
- METZNER, H.L.; LAMPHEAR, D.E.; WHEELER, N.C.; LARKIN, F.A. The relationship between frequency of eating and adiposity in adult men and women in the Tecumseh Community Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.30, p.712-15, 1977.

- MILLER, G.D.; HRUPKA, B.J.; GIETZEN, D.W.; ROGERS, Q.R.; STERN, J.S. Influence of dietary carbohydrate on skeletal muscle glucose uptake. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.41: p.526-32, 1985.
- MILLER, G.D.; HRUPKA, B.J.; GIETZEN, D.W.; ROGERS, Q.R.; STERN, J.S. Rats on a macronutrient self-selection diet eat more meals from a single food cup. *Appetite*. New York, v.23: p.67-78, 1994.
- MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; SOUZA, A. L.M.; POPKIN, B.M. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. In: MONTEIRO, C.A.: *Velhos e novos males da saúde no Brasil – a evolução do país e de suas doenças*. São Paulo, Hucitec-NUPENS/USP, 1995a. p.247-55.
- MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; SOUZA, A.L.M.; POPKIN, B.M. The nutrition transition in Brazil. *Eur. J. Clin. Nutr.* Hampshire, v.49, p.105-13, 1995b.
- OLIVEIRA, J.E.; MILECH, A.; FRANCO, L.J. The prevalence of diabetes in Rio de Janeiro, Brazil. *Diabetes Care*. New York, v.19, p.663, 1996.
- OMS ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry*. Geneva, 1995. [Technical Report Series, 854].
- OMS ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Obesity – preventing and managing the global epidemic*. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva, 1998.
- PAGLIASSOTTI, M.J.; HORTON, T.J.; GAYLES, E.C.; KOPPENHAFFER, T.A.; ROSENZWEIG, T.D.; HILL, J.O. Reduced insulin suppression of glucose appearance is related to susceptibility to dietary obesity in rats. *Am. J. Physiol (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)*. Bethesda, v.272, n.41, p.R1264-70, 1997.
- PARKER, D.R.; WEISS, S.T.; TROISI, R.; CASSANO, P.A.; VOKONAS, P.S.; LANDSBERG, L. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentration: the Normative Aging Study. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.58, p.129-36, 1993.
- PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R.P.; KLOPFER, M.; PERROTI, A.C.; CAMPOS, P.L.; SAWADA, L.A.; COSTA, S.R.; LANCHETA JR., A.H. Different intensities of physical activities with or without hypocaloric diet: effects on body composition, food consumption and plasmatic profile in obese women. *Med. Sci. Sports Exerc.* Baltimore, v.30, p.S238, 1998.
- POPKIN, B.M.; DOAK, C.M. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. *Nutr. Rev.* Washington DC, v.56, p.106-14, 1998.
- PRENTICE, A.M. Manipulation of dietary fat and energy density and subsequent effects on substrate flux and food intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.67 (suppl), p.535S-41S, 1998.
- ROCCHINI, A.P.; MARKER, P.; CERVENKA, T. Time course of insulin resistance associated with feeding dogs a high-fat diet. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)*. Bethesda, v.272, n.35, p.E147-54, 1997.
- ROMSOS, D.R.; LEVILLÉ, G.A. Effect of meal frequency and diet composition on glucose tolerance in the rat. *J. Nutr.* Bethesda, v.104, p.1503-12, 1974.
- RUGGERI, G.B. *Influência da composição da dieta sobre o pâncreas endócrino de ratos normais*. São Paulo, 1999. Tese (Doutorado em Medicina). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- SANTOS, A.; VILLELA, F.G.; MACHADO, U.F.; CURI, R.; CARPINELLI, A.R. Insulin secretion in the isolated islets of single-, regular-fasted and fed rats. *Physiol. Behav.* New York, v.45, p.923-7, 1989.
- SBC SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Programa nacional de prevenção e epidemiologia [on line]. 1999. [citado em 14/04/99]. Disponível no endereço: <www.cardiol.br/epidemio.htm >
- SCLAFANI, A. Dietary obesity models. In: BJÖRNTORP, P.; BRODOFF, B. N. *Obesity*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1992, p.241-248.

- SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol. Behav.* New York, v.17, p.461-71, 1976.
- SEGUÉS, T.; SALVADÓ, J.; AROLA, L.; ALEMANY, M. Long-term effects of cafeteria diet feeding on young wistar rats. *Biochem. Mol. Biol. Int.* New York, v.22, p.321-8, 1994.
- SEIDELL, J.C. Obesity insulin resistance and diabetes – a worldwide epidemic? In: DIET AND THE METABOLIC SYNDROME – INTERNATIONAL SYMPOSIUM; Ystad (Sweden), 1999. Ystad: Swedish Nutrition Foundation; 1999, p.20.
- STANSBIE, D.; BROWNSEY, R.W.; CRETAAZ, M.; DENTON, R.M. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem. J.*, London, v.160, p.413-6, 1976.
- STEVENSON, J.A.F.; FELEKI, V.; SZLAVKO, A.; BEATON, J.R. Food restriction and lipogenesis in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* Stanford, v.116, p.178-82, 1964.
- STORLIEN, L.H.; BAUR, L.A.; KRICKETUS, A.D.; PAN, D.A.; COONEY, G.J.; JENKINS, A.B.; CALVERT, G.D.; CAMPBELL, L.V. Dietary fats and insulin action. *Diabetologia.* Heidelberg, v.39, p.621-31, 1996.
- STORLIEN, L.H.; JAMES, D.E.; BURLEIGH, K.M.; CHISHOLM, D.J.; KRAEGER, E.W. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am. J. Physiol.* (Endocrinol. Metab.). Bethesda, v.251, n.14, p.E576-83, 1986.
- SUMMERBELL, C.D.; MOODY, R.C.; SHANKS, J.; STOCK, M.J.; GEISSLER, C. Relationship between feeding pattern and body mass index in 220 free-living people in four age groups. *Eur. J. Clin. Nutr.* Hampshire, v.50, p.513-9, 1995.
- SWINBURN, B.; RAVUSSIN, E. Energy balance or fat balance? *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.57 (Suppl), p.766S-71S, 1993.
- TREMBLAY, A.; ALMÉRAS, N.; BOER, J.; KRANENBARG, E. K.; DESPRÉS, J.P. Diet composition and postexercise energy balance. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.59, p.975-9, 1994.
- VERBOEKET-VAN DE VENNE, W.P.H.G.; WESTERP, K.R.; KESTER, A.D.M. Effect of the pattern of food intake on human energy metabolism. *Br. J. Nutr.* Cambridge, v.70, p.103-115, 1993.
- WEST, D. B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am. J. Clin. Nutr.* Bethesda, v.67, p.505S-12S, 1998.
- WILKES, J.J.; BONEN, A.; BELL, R.C. A modified high-fat diet induces insulin resistance in rat skeletal muscle but not adipocytes. *Am. J. Physiol.* (Endocrinol. Metab.). Bethesda, v.275, n.38, p.E679-86, 1998.
- WOLEVER, T.M.S. Metabolic effects of continuous feeding. *Metabolism.* London, v.39, p.947-51, 1990.

Recebido para publicação em
26/07/02. Aprovado em 06/12/02.

Hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado como fonte de oligopeptídeos para formulações dietéticas

Enzymatic hydrolysates from skimmed powder milk as source of oligopeptides for dietary formulations

ABSTRACT

LOPES, D.C.F.; SILVA, V.D.M.; MORAIS, H.A.; SANTORO, M.M.; FIGUEIREDO, A.F.S.; SILVESTRE, M.P.C. Enzymatic hydrolysates from skimmed powder milk as source of oligopeptides for dietary formulations. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP. v.24, p.51-70, dez., 2002.

*Six enzymatic hydrolysates from skimmed powder milk were prepared with the aim of producing dietary formulations for phenylketonurics. A protease from *Aspergillus oryzae* (AO) alone or in association with papain (PA) was used in different reaction times and enzyme:substrate ratios (E:S, 1 to 20%). The interest of this work is associated with the study of the peptide distribution in these samples, according to the chain size, in order to evaluate their nutritional quality. Initially, the hydrolysates were fractionated by size-exclusion HPLC and the rapid method of Correct Fraction Area (CFA) was used for quantifying peptides and free amino acids in the chromatographic fractions. The results showed that the skim powder milk hydrolysate obtained by the association of AO with PA in ratio of 1% and 2%, respectively, in relation to the skim powder milk, 5 h incubation at 50 °C, produced the best peptide profile, with larger proportion of di- and tripeptides and lower of free amino acids.*

Keywords: dietary formulation, peptide profile, enzymatic hydrolysis, phenylketonuria, skimmed powder milk, papain, protease from *Aspergillus oryzae*

DANIELLA CRISTINE FIALHO LOPES ¹, VIVIANE DIAS MEDEIROS SILVA ², HARRIMAN ALEY MORAIS ², MARCELO MATOS SANTORO ³, AMINTAS FABIANO DE SOUZA FIGUEIREDO ⁴, MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE ^{2*}

¹Departamento de Alimentos, FF/UFMG.

²Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG.

⁴Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FF/UFMG.

¹Trabalho baseado na dissertação de mestrado Perfil peptídico e remoção de fenilalanina de hidrolisados de leite em pó desnatado: tratamento em solução com carvão ativado. Realizado no Departamento de Alimentos, FF/UFMG, 2000.

Endereço para correspondência:
Av. Olegário Maciel, 2360, Bairro Lourdes, CEP: 30180-112, Belo Horizonte, MG. E-mail: malice@farmacia.ufmg.br

Agradecimentos:
Ao apoio financeiro das agências CAPES, CNPq e FAPEMIG nas formas de Auxílio à Pesquisa e bolsas de Mestrado, Aperfeiçoamento e Iniciação Científica.

RESUMEN

Seis hidrolisados de leche en polvo desnatado fueron preparados con el objetivo de producir formulaciones dietéticas. Para eso, fue utilizada una protease de *A.oryzae* (AO), aislada o en asociación con la papaína (PA), en diferentes tiempos de reacción y relación enzima:substrato (E:S). El interés de ese trabajo está asociado al estudio de la distribución de los péptidos, en esas muestras, de acuerdo con el tamaño de las cadenas, como criterio de evaluación de la calidad nutricional. Inicialmente, los hidrolisados fueron fraccionados por cromatografía líquida de alta eficiencia de exclusión molecular (SE-HPLC) y para la cuantificación de los componentes de las fracciones cromatográficas, fue utilizado el método rápido de la Área Corregida de la Fracción (ACF). Los resultados indican que el hidrolisado de leche en polvo desnatado obtenido con la asociación de las enzimas AO y PA, en las proporciones de 1% y 2%, respectivamente, en relación a la cantidad de leche en polvo desnatado, con 5h de incubación a 50 °C, produjo el mejor perfil peptídico, o sea, mayor proporción de di- y tripeptídeos y menor proporción de aminoácidos libres.

Palabras clave: formulacione dietética, perfil peptídico, fenilcetonúria, hidrólise enzimática, leche en polvo desnatado, papaína, protease de *Aspergillus oryzae*

RESUMO

Seis hidrolisados de leite em pó desnatado foram preparados visando a produção de hidrolisados protéicos para uso em formulações dietéticas para fenilcetonúricos. Para isso utilizaram-se uma protease do *Aspergillus oryzae* (AO), isoladamente ou em associação com a papaína (PA), em diferentes tempos de reação e relação enzima:substrato (E:S). O interesse deste trabalho está associado ao estudo da distribuição dos peptídios nestas amostras, de acordo com o tamanho da cadeia, como critério de avaliação de sua qualidade nutricional. Inicialmente, os hidrolisados foram fracionados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) e, para a quantificação dos componentes das frações cromatográficas, empregou-se o método rápido da Área Corregida da Fração (ACF). Os resultados indicam que o hidrolisado de leite em pó desnatado obtido com a associação das enzimas AO com a PA nas proporções de 1% e 2%, respectivamente, em relação à quantidade de leite em pó desnatado, com 5 h de incubação a 50 °C, produziu o melhor perfil peptídico, a saber, maior proporção de di- e tripeptídeos e menor proporção de aminoácidos livres.

Palavras-chave: formulação dietética, perfil peptídico, hidrólise enzimática, fenilcetonúria, leite em pó desnatado, papaína, protease do *Aspergillus oryzae*

INTRODUÇÃO

Desde 1940, os hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados com finalidades terapêuticas para a manutenção do estado nutricional de pacientes com restrições de proteínas ou aminoácidos em sua dieta. O emprego destas preparações enzimáticas apresentou expressivo crescimento ao longo dos últimos anos, tanto por seus aspectos nutricionais e clínicos, como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas (CÂNDIDO, 1998; LEÓNIL *et al.*, 2000). Assim, os hidrolisados de proteínas têm sido usados na fabricação de alimentos especiais para recém-nascidos prematuros, em fórmulas para crianças que apresentam diarreia, gastroenterite, má-absorção e fenilcetonúria (SMITHERS e BRADFORD, 1991; CLEMENTE, 2000). Além disso, são empregados na suplementação de dietas para idosos, na nutrição de esportistas e em dietas para controle de peso (FRØKJAER, 1994).

O valor nutricional dos hidrolisados está diretamente relacionado à natureza da proteína de origem, que deverá ser de alto valor nutricional, e ao método de hidrólise que possibilite a obtenção de misturas de peptídios com pesos moleculares diferentes (GRIMBLE *et al.*, 1986; SILVESTRE *et al.*, 1994a,b).

Vários trabalhos têm comparado a absorção de aminoácidos originados da hidrólise enzimática de proteínas com uma mistura equivalente de aminoácidos livres. A velocidade de absorção intestinal de aminoácidos é consideravelmente maior nas soluções contendo di- e tripeptídeos ou proteína parcialmente hidrolisada, do que nas soluções contendo apenas aminoácidos livres (ADIBI e MORSE, 1971; ADIBI e SOLEIMANPOUR, 1974; KEOHANE *et al.*, 1985; BOZA *et al.*, 1995; SYNOWIECKI *et al.*, 1996). O estudo do mecanismo de absorção intestinal de aminoácidos e de pequenos peptídios revela que a taxa de absorção de aminoácidos livres é menor do que aquela dos pequenos peptídios, sugerindo que na absorção de di- e tripeptídeos a competição entre aminoácidos, que compartilham o mesmo sistema de transporte, seja parcial ou completamente eliminada (GRIMBLE *et al.*, 1986; CLEMENTE, 2000).

Alguns autores têm usado diferentes enzimas, em diferentes condições hidrolíticas na obtenção de hidrolisados protéicos especiais para a nutrição de fenilcetonúricos (KITAGAWA *et al.*, 1987; LOPEZ-BAJONERO *et al.*, 1991; MOSZCZYNSKI e IDZIAK, 1993; KASAI *et al.*, 1994; OUTINEN *et al.*, 1996; TESMER *et al.*, 1998; ETZEL e MADISON, 1999). Entretanto, em nenhum destes trabalhos foi realizada uma avaliação dos hidrolisados em função do seu perfil peptídico para quantificar os oligopeptídeos dos hidrolisados. Esta etapa seria importante visto que a qualidade nutricional e a imunogenicidade de um hidrolisado está diretamente relacionado ao teor de grandes, médios, di- e tripeptídeos além dos aminoácidos livres (GRIMBLE *et al.*, 1986; SILVESTRE *et al.*, 1994a,b).

Nosso interesse pelos hidrolisados protéicos, relaciona-se ao preparo de formulações dietéticas para fenilcetonúricos. Este trabalho representa o primeiro passo nesta direção e consiste em caracterizar o perfil peptídico de hidrolisados protéicos. Assim, uma protease do *Aspergillus oryzae* foi utilizada, isoladamente ou em associação com a papaína, em diferentes condições de reação, para hidrolisar o leite em pó desnatado e

produzir hidrolisados protéicos com perfil peptídico adequado para fins dietéticos, ou seja, maior proporção de di- e tripeptídeos e menor de aminoácidos livres. Os hidrolisados foram fracionados por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) e os peptídios e os aminoácidos livres quantificados pelo método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF) desenvolvido por SILVESTRE et al. (1994 a, b).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usado no fracionamento dos hidrolisados protéicos consistiu de uma coluna cromatográfica PHEA [poli-(2-hidroxietilaspártamida)-sílica], 250 X 9,4 mm, 5 μ m e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico em UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software HPchemstation (Avondale, EUA). As amostras foram liofilizadas no liofilizador Free Zone, modelo 77500, Labconco (Kansas City, MI, EUA). A pancreatina, a tripsina, a protease tipo XXIII do *Aspergillus oryzae* (P-4032), o fenol cristalino, o ácido clorídrico e trietanolamina (grau HPLC) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA). A papaína foi gentilmente doada pela BIOBRÁS (Montes Claros, MG, Brasil). O leite em pó desnatado da marca Glória (Itaperuna, RJ, Brasil), sem adição de vitaminas ou sais minerais, foi comprado em um supermercado de Belo Horizonte. A água, para uso no cromatógrafo, foi purificada pelo Sistema de Purificação de Água Aries (Vaponics, EUA). As membranas de celulose, para filtração das amostras (0,20 μ m) e dos solventes (0,45 μ m), foram adquiridas da Sartorius (Alemanha).

As frações foram coletadas no sistema Spectra/Chrom[®], CF1 Fraction Collector (Houston, EUA). A análise de aminoácidos foi realizada em coluna de cromatografia de fase reversa (C18) Pico Tag[®] – Waters (Massachusetts, EUA), HPLC com detector espectrofotométrico de comprimento de onda variável e computador Cromatopac – CR4A Shimadzu (Kyoto, Japão). A hidrólise ácida foi realizada em tubos de borossilicato Pyrex (Corning, New York, EUA).

O fenilisotiocianato e a solução padrão de aminoácidos foram adquiridos da Pierce (Rockford, EUA). O ácido fórmico, o álcool etílico (grau HPLC), o álcool metílico (grau HPLC) e o acetato de sódio foram adquiridos da Merck (Whitehouse Station, NJ, EUA); a acetonitrila (grau HPLC) foi adquirida da Baker Analysis (Phillipsburg, NJ, EUA) e o nitrogênio foi adquirido da White Martins (São Paulo, Brasil).

MÉTODOS

PREPARO DA CURVA PADRÃO

Para quantificar os peptídios e os aminoácidos livres nos hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado, foi desenhada uma curva padrão constituída da Área Corrigida da Fração (ACF) versus o conteúdo de aminoácidos das frações separadas por SE-HPLC dos hidrolisados-padrão como descrito por SILVESTRE *et al.* (1994b) e MORATO *et al.* (2000).

PREPARO DOS HIDROLISADOS-PADRÃO DE LEITE EM PÓ DESNATADO

Cinco hidrolisados-padrão foram preparados, de acordo com o método descrito por SILVESTRE *et al.* (1994a). As soluções de leite em pó desnatado preparadas em tampão fosfato 0,01mol/L (pH 7,5), contendo em 1% (p/v) de proteína, foram, inicialmente, pré-aquecidas em banho-maria a 80 °C por 10 min. A seguir, a temperatura foi ajustada para 37 °C, e as enzimas, pancreatina ou tripsina foram adicionadas em quantidades (p/p) para se obter a relação enzima:substrato (E:S) desejada (Tabela 1). As incubações foram realizadas em diferentes intervalos de tempo (Tabela 1) e as hidrólises foram interrompidas abaixando o pH para 2,5 com a adição de ácido fórmico p.a. Os hidrolisados-padrão assim preparados foram, então, liofilizados. As outras condições das reações estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 Condições hidrolíticas empregadas na preparação dos hidrolisados-padrão de leite em pó desnatado

Hidrolisados	E:S	(%)	Tempo de hidrólise
	P	T	(h)
P1	4	—	06
P2	0,5	—	02
P3	0,5	—	06
T1	—	0,5	15
T2	—	4	02

Relação E:S = Relação enzima:substrato; P= pancreatina; T= tripsina

FRACIONAMENTO DOS HIDROLISADOS-PADRÃO

O fracionamento dos hidrolisados-padrão foi realizado por SE-HPLC em coluna PHEA, como descrito por SILVESTRE *et al.* (1994b). As amostras liofilizadas foram dissolvidas em quantidades suficientes para preparar soluções a 0,4% (p/v), em solução de ácido fórmico 0,05 mol/L (pH 2,5) e cromatografadas à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/min durante 35 min. A fase móvel foi filtrada,

em membrana de 0,45 µm, e sonicada imediatamente antes do uso. A detecção dos picos cromatográficos foi realizada em três comprimentos de onda: 230, 280 e 300 nm, cada hidrolisado foi cromatografado dez vezes e quatro frações (F1-F4) foram coletadas após cada cromatografia, sendo F1 de 14,4 a 18,9 min; F2 de 18,9 a 22,4 min; F3 de 22,4 a 23,4 min e F4 de 23,4 a 33 min. O solvente foi removido, de cada fração, em evaporador Centrivap (Labconco, EUA).

ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

Uma alíquota de cada fração dos hidrolisados coletada na cromatografia em SE-HPLC, foi evaporada, e hidrolisada em HCL 5,7 mol/L a 110 °C por 24 h. Após a hidrólise, os solventes e componentes voláteis foram removidos por centrifugação na centrífuga Speed Vac (Unequip, EUA), a 50 °C por 15 min. Para neutralizar qualquer ácido residual que tenha ficado no tubo, acrescentou-se a cada tubo 20 µL da solução de ressecagem (metanol:água:trietilamina – 2:2:1) os tubos foram agitados em Vortex (Ika, EUA) e, em seguida, o material foi novamente seco na Speed Vac a 50 °C por 15 min. Para a derivatização das amostras, foi preparada uma solução misturando-se etanol, água, trietilamina e fenilisotiocianato (PITC) na proporção de 7:2:1:1, respectivamente. A cada tubo contendo o material evaporado, foram adicionados 20 µL desta solução e, após homogeneização, os tubos foram deixados a 25 °C por 20 min. O excesso de reagente foi removido por centrifugação na centrífuga Speed Vac a 25 °C durante uma hora. Cada amostra derivatizada seca foi dissolvida em 150 µL de tampão acetato de sódio 0,14 mol/L (pH 7,5), contendo 5% (v/v) de acetonitrila. A seguir, 20 µL de cada amostra foi cromatografada em fase reversa a 40 °C com um fluxo de 1 mL/min. As concentrações de triptofano foram determinadas apenas nas frações não hidrolisadas.

CÁLCULO DA ÁREA CORRIGIDA DA FRAÇÃO (ACF)

A ACF foi determinada pelo método desenvolvido por SILVESTRE *et al.* (1994b), baseado na multidetecção das frações em três comprimentos de onda (230, 280 e 300 nm). Considerando que a absorção a 230 nm da tirosina e do triptofano é superior a dos outros aminoácidos, é necessário se fazer uma correção da área das frações (ACF), eliminando-se a interferência destes dois aminoácidos. Para tal, faz-se a corrida dos cromatogramas nestes três comprimentos de onda e, posteriormente, através de cálculo, chega-se à ACF. Finalmente, a ACF foi relacionada ao teor de aminoácidos das frações obtendo-se, assim, a curva padrão.

PREPARAÇÃO DOS HIDROLISADOS TESTES DE LEITE EM PÓ DESNATADO

As soluções de leite em pó desnatado preparadas a 0,35% (p/v) (conteúdo correspondendo à concentração protéica de 0,25%) em tampão fosfato 0,01 mol/L (pH 6,0), foram, inicialmente, aquecidas a 80 °C por 10 min. A seguir, a temperatura foi reduzida

a 50 °C, por meio do banho de gelo, e as enzimas, uma protease do *Aspergillus oryzae* (AO) isoladamente ou em associação com a papaína (PA), foram adicionadas em quantidades suficientes para se obter as relações E:S desejadas (Tabela 2). As hidrólises foram, então, interrompidas pela redução da temperatura para 10°C (banho de gelo). Em seguida, os hidrolisados foram liofilizados. As outras condições das reações estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Condições hidrolíticas empregadas no preparo dos hidrolisados testes de leite em pó desnatado

Hidrolisados	Tempo de hidrólise (h)	E:S (%)	
		AO	PA
H1	AO (1h) + PA (4h)	1	2
H2	AO (2h) + PA (8h)	1	2
H3	AO (5h) + PA (20h)	1	2
H4	AO (15h) + PA (10h)	1	2
H5	AO (5h)	1	—
H6	AO (1h) + PA (4h)	10	20

E:S = Relação enzima:substrato; AO= protease do *Aspergillus oryzae*; PA= papaína

A escolha das condições de reação para a preparação dos hidrolisados testes, baseou-se no seguinte critério: o hidrolisado H3 tomado como referência, reproduzindo as condições hidrolíticas usadas por LOPEZ-BAJONERO *et al.* (1991) que possibilitaram, ao autor, a maior remoção de Phe. Nos demais hidrolisados as condições foram modificadas, reduzindo-se o tempo de ação das enzimas (hidrolisados H1, H2 e H4), elevando-se a relação E:S (hidrolisado H6) ou empregando-se apenas uma das enzimas (hidrolisado H5).

FRACIONAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE PEPTÍDIOS E AMINOÁCIDOS LIVRES DOS HIDROLISADOS TESTES DE LEITE EM PÓ DESNATADO

Os hidrolisados testes foram fracionados pelo mesmo procedimento descrito para os hidrolisados-padrão. A quantificação dos peptídeos e dos aminoácidos livres presentes nos hidrolisados testes foi realizada pelo método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF) segundo SILVESTRE *et al.* (1994b). A partir dos valores da ACF, as quantidades dos peptídeos e dos aminoácidos livres foram determinados por interpolação gráfica na curva padrão.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata. Para as determinações das diferenças entre as médias e dos conteúdos de aminoácidos das frações cromatográficas dos hidrolisados de leite em pó desnatado foram realizadas a Análise Fatorial e o Teste de Duncan. Na determinação da diferença entre as médias das áreas dos picos da Phe nos hidrolisados de leite em pó desnatado foram realizadas a Análise de Variância (ANOVA fator único) e o teste de Duncan. A regressão linear foi usada para a curva padrão. (GOMES, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS-PADRÃO

FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - EXCLUSÃO MOLECULAR (SE-HPLC)

A título de exemplo, o perfil cromatográfico do hidrolisado padrão P1 está apresentado na Figura 1. Os hidrolisados-padrão foram separados em quatro frações (F1 - F4) por SE-HPLC (Figura 1). A fração 1 corresponde aos peptídios contendo mais que 7 resíduos de aminoácidos; a fração 2, de 4 a 7 resíduos de aminoácidos; a fração 3, di- e tripeptídeos e a fração 4 contendo os aminoácidos livres, como descrito anteriormente (SILVESTRE *et al.*, 1994b, MORATO *et al.*, 2000; CARREIRA *et al.*, 2001; MORAIS *et al.*, 2002).

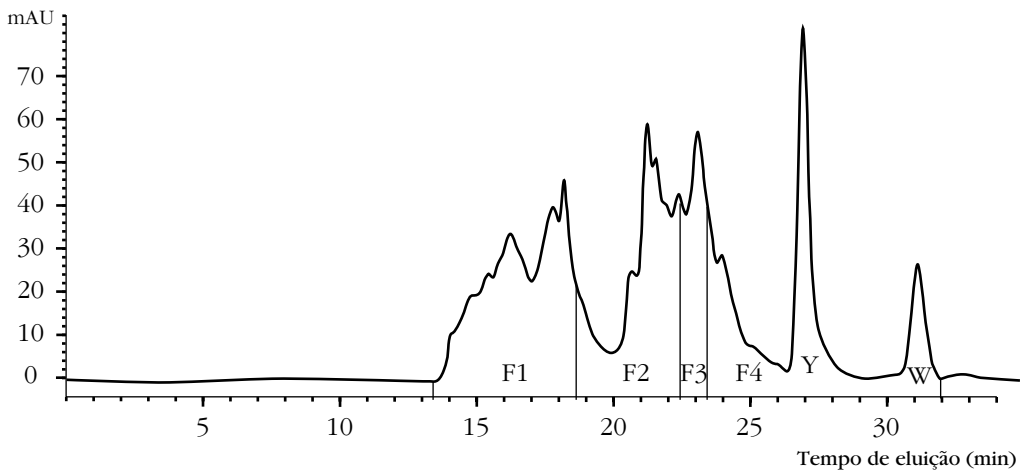


Figura 1 Perfil cromatográfico do hidrolisado padrão P1. Condições: Coluna PHEA (250 x 9,4 mm, 5 μ m e 200 \AA - PolylC), 6h de hidrólise com pancreatina em tampão fosfato de sódio, pH 7,5, E:S = 4% a 37 $^{\circ}$ C. Detecção das frações em 230 nm. F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano.

CURVA PADRÃO

A curva padrão do método da Área Corrigida da Fração (ACF), apresentada na Figura 2, é composta pelos valores de ACF versus as quantidades de aminoácidos livres resultantes das hidrólises ácidas das frações cromatográficas provenientes dos hidrolisados enzimáticos do leite em pó desnatado. Foram usados os valores de ACF das quatro frações cromatográficas isoladas da coluna SE-HPLC. Foi obtida uma correlação de 0,9583 ($P < 0,001$), muito próxima das correlações de 0,9858 ($P < 0,001$) e 0,9845 ($P < 0,001$) obtidas por SILVESTRE *et al.* (1994b) e MORATO *et al.* (2000), respectivamente, para as curvas padrões resultantes de trabalhos com a caseína.

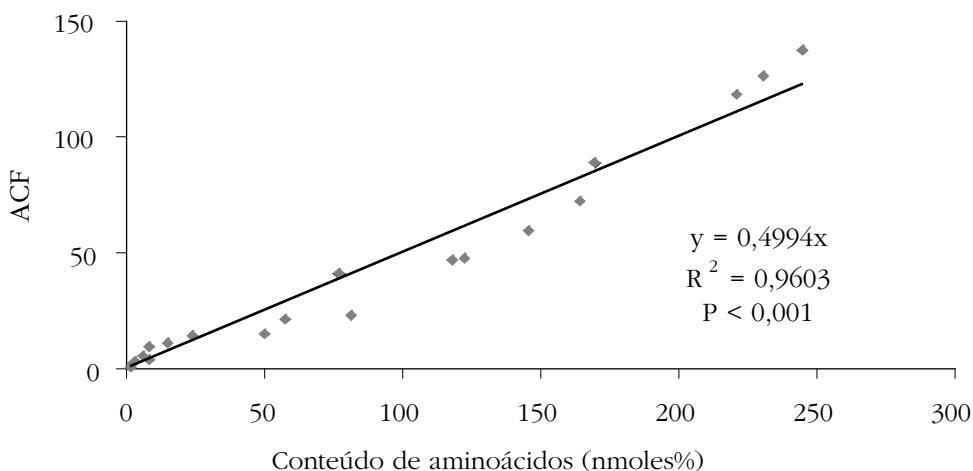


Figura 2 Curva padrão para a quantificação dos teores de peptídios e aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados de leite em pó desnatado. ACF = Área Corrigida da Fração.

CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS TESTES DE LEITE EM PÓ DESNATADO

FRACIONAMENTO EM SE-HPLC

O perfil cromatográfico do hidrolisado H1, a 230 nm, está apresentado na Figura 3. Como pode-se observar, foram separadas quatro frações cromatográficas (F1 – F4). Os últimos dois picos (Y e W) na fração 4, correspondem à tirosina e ao triptofano, respectivamente.

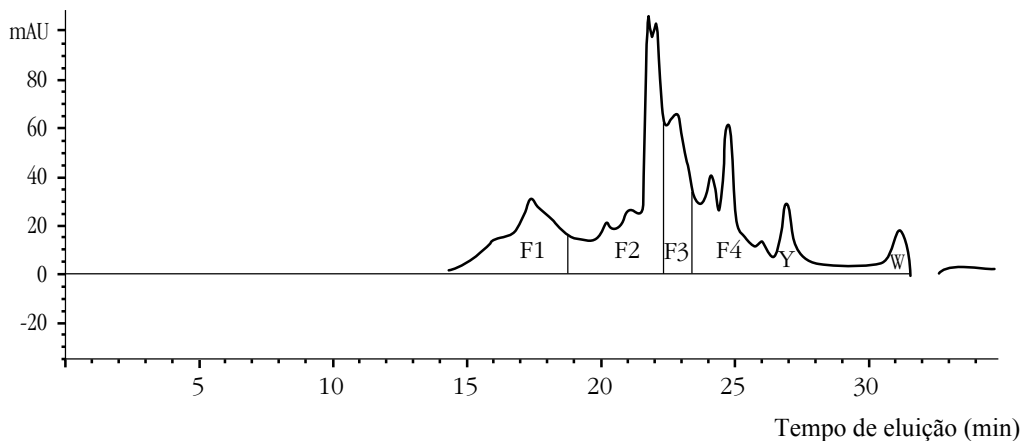


Figura 3 Perfil cromatográfico do hidrolisado teste H1. Condições: Coluna PHEA (250 x 9,4 mm, 5 μ m e 200 Å – PolylC), 1h de hidrólise com a protease do *Aspergillus oryzae* (relação E:S = 1%) mais 4h de hidrólise com a papaína (relação E:S = 2%) em tampão fosfato de sódio, pH 6,0, a 50 °C. Detecção das frações em 230 nm. F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano.

Diferentes técnicas têm sido utilizadas no fracionamento de peptídios em hidrolisados protéicos. A maioria refere-se ao fracionamento de peptídios com massa molecular superior a 1000 Da. Dentre estas técnicas destacam-se a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a cromatografia de exclusão molecular (SEC), a HPLC capilar e de troca de ligante (LEMIEUX e AMIOT, 1990; ADACHI *et al.*, 1991; ARMSTEAD e LING, 1991; AUBRY *et al.*, 1992; DAVIS e LEE, 1992; VISSER *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1992; GALLAGHER *et al.*, 1993; PARRADO *et al.*, 1993; PEREA *et al.*, 1993).

Estas técnicas têm demonstrado uma série de inconvenientes, tais como, interações secundárias (eletrostáticas ou hidrofóbicas) entre os solutos e a fase estacionária e a ineficiência para separar pequenos peptídios (VERNEUIL *et al.*, 1990; LEMIEUX *et al.*, 1991; GOLOVCHENKO *et al.*, 1992). Outros autores como LEMIEUX e AMIOT (1990) e DAVIS e LEE (1992), respectivamente, relataram a dificuldade de separar os peptídios de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de pesos moleculares empregando a SE-HPLC ou a HPLC capilar.

Entretanto, a técnica de SE-HPLC utilizada no presente trabalho, mostrou ser eficiente na caracterização de hidrolisados protéicos, especialmente quando o interesse está voltado para o fracionamento de peptídios de baixas massas moleculares, ou seja, inferiores a 1000 Da (SILVESTRE *et al.*, 1994a, LÉONIL *et al.*, 2000; MORATO *et al.*, 2000, CARREIRA *et al.*, 2001a, b; MORAIS *et al.*, 2002).

QUANTIFICAÇÃO DE PEPTÍDIOS E AMINOÁCIDOS LIVRES DOS HIDROLISADOS TESTES

O teor de peptídios e aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados testes está apresentado na Tabela 3. Observa-se uma semelhança, do ponto de vista nutricional, no perfil peptídico dos hidrolisados de H1 a H5, com ligeira superioridade para H1, que apresentou o menor teor de aminoácidos livres. Neste sentido, fica, também, evidenciada a vantagem, embora pequena, do emprego da protease do *Aspergillus oryzae* (AO) em associação com a papaína (PA) (hidrolisado H1) sobre a sua ação isolada (hidrolisado H5).

Considerando-se os diversos fatores citados por GONZALEZ-TELLO (1994), que devem ser avaliados em um hidrolisado protéico para uso em dietas especiais, pode-se concluir que, os melhores resultados foram obtidos para os hidrolisados H1, H2, H3, H4 e H5, uma vez que apresentaram maiores teores de di- e tripeptídeos (média de 14%) e peptídios com massa molecular média de 500 Da (média de 38%) e, além disso, baixa porcentagem de aminoácidos livres (média de 27%).

Ressalta-se, ainda, na Tabela 3, que o hidrolisado H6 apresentou o menor teor de grandes peptídios mas, por outro lado, possui uma quantidade de aminoácidos livres bem mais elevada que os demais hidrolisados. Além disso, o H6 foi o mais pobre em médios e di- e tripeptídeos. Por tudo isto, este hidrolisado pode ser considerado o que apresenta o perfil peptídico mais desvantajoso, do ponto de vista nutricional, como também no aspecto econômico, uma vez que a quantidade de enzimas empregada no seu preparo é dez vezes maior que a dos demais hidrolisados. Entretanto, o seu teor elevado de aminoácidos livres poderia levar a uma maior remoção de Phe. Assim sendo, esta preparação deve também ser testada quanto ao desenvolvimento de formulações dietéticas para fenilcetonúricos.

Comparando-se os resultados da Tabela 3 com os obtidos em outros trabalhos, nos quais uma enzima de origem microbiana foi empregada isoladamente e em associação com outra enzima, verifica-se uma certa semelhança. Assim, CHATAUD *et al.* (1988) relataram a superioridade da associação enzimática da tripsina com duas enzimas de origem bacteriana, em relação à ação isolada da tripsina, obtiveram um hidrolisado contendo 75% de di- e tripeptídeos (F3). CARREIRA *et al.* (2001b) também obtiveram melhores perfis peptídicos de hidrolisados de caseína, do ponto de vista nutricional, quando associaram a pepsina com a tripsina e a subtilisina, do que quando empregaram a pepsina isoladamente. Por outro lado, MORATO *et al.* (2000) observaram que o hidrolisado de caseína obtido pela ação isolada da subtilisina apresentou melhor perfil peptídico em relação ao teor de di- e tripeptídeos, se comparado ao hidrolisado obtido através de sua associação com a tripsina.

Finalmente, é interessante observar que as alterações das condições hidrolíticas empregadas por LOPEZ-BAJONERO *et al.* (1991), foram benéficas (H1) ou desvantajosas (H6), do ponto de vista nutricional. A seguir, será apresentada uma análise detalhada das diversas condições hidrolíticas sobre o perfil peptídico dos hidrolisados testes.

Tabela 3 Teor de peptídios e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados testes

Hidrolisados	FRAÇÕES			
	F1	F2	F3	F4
H1	26,29 ^{1/b}	41,72 ^{1/a}	13,07 ^{1,2/c}	18,92 ^{3/b,c}
H2	25,62 ^{1/a}	32,27 ^{2/a}	11,27 ^{1,2/b}	30,84 ^{2/a}
H3	18,39 ^{1,2/b}	36,14 ^{1,2/a}	14,63 ^{1,2/b}	30,84 ^{2/a}
H4	14,16 ^{2/b}	36,02 ^{1,2/a}	16,24 ^{1/b}	33,58 ^{2/a}
H5	25,55 ^{1/b}	37,80 ^{1,2/a}	10,92 ^{1,2/c}	25,73 ^{2,3/b}
H6	6,18 ^{3/c}	18,74 ^{3/b}	6,35 ^{2/c}	68,73 ^{1/a}

* Os valores são apresentados em nmoles% (porcentagem do número de nmoles das quatro frações). Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um mesmo hidrolisado. F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres.

COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS

Não foram encontrados dados na literatura abordando o perfil peptídico obtido da hidrólise enzimática do leite em pó desnatado. Este alimento é constituído de uma mistura de vários nutrientes. Entre as proteínas, cerca de 80% é representado pela caseína. Portanto, a seguir serão feitas comparações com trabalhos que prepararam o perfil peptídico a partir da caseína.

EFEITO DA RELAÇÃO E:S

A influência da relação E:S na ação da AO e da PA sobre leite em pó desnatado pode ser avaliada na Figura 4.

Aumentando-se dez vezes a relação E:S das duas enzimas, de 1% para 10% para AO e de 2% para 20% para PA (hidrolisados H1 e H6, respectivamente), observou-se uma alteração significativa no conteúdo de todas as frações cromatográficas, produzindo um perfil peptídico de qualidade nutricional inferior. Houve diminuição dos níveis de médios, di- e tripeptídeos, assim como aumento do teor de aminoácidos livres. A única alteração vantajosa, do ponto de vista nutricional, refere-se ao decréscimo no conteúdo de grandes peptídios (Tabela 3). Este grande aumento da E:S, ao invés de promover a hidrólise dos grandes e médios peptídios a di- e tripeptídeos, levou à hidrólise destes a aminoácidos livres. Isto poderia estar associado, pelo menos em parte, ao fato de que

a 10% e 20%, levou apenas à pequena formação de di- e tripeptídeos contendo fenilalanina como segundo aminoácido, a partir da porção carboxi-terminal, os quais, de acordo com LENIER (1974) e REED (1975), não serviriam de substratos para a ação da papaína. Além disto, este aumento da relação E:S seria inadequado, do ponto de vista econômico, devido ao custo, principalmente das enzimas, se for considerado uma produção em larga escala.

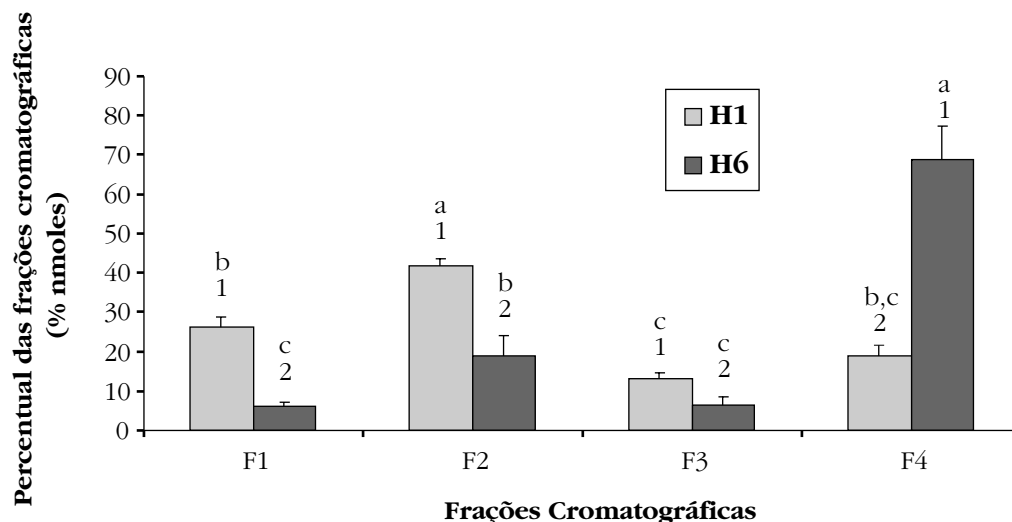


Figura 4 Teor de aminoácidos das frações cromatográficas de hidrolisados de leite em pó desnatado, obtidos da ação associada da protease do *Aspergillus oryzae* e da papaína: efeito da relação E:S. H1: 1% e 2%; H6: 10% e 20%. F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado.

Outros trabalhos também relataram o efeito da relação E:S sobre os teores de peptídios em hidrolisados protéicos sendo que, em alguns casos, os resultados foram benéficos e, em outros, prejudiciais para o perfil peptídico. Assim, LOOSEN *et al* (1991) testaram o emprego da subtilisina na hidrólise da caseína, variando-se a relação E:S de 1 a 4%, obtendo os melhores resultados empregando-se a relação E:S de 2%, que levou à obtenção de um hidrolisado contendo 75% de di- e tripeptídeos e apenas 5% de aminoácidos livres.

MORATO *et al* (2000) estudaram a ação da subtilisina isoladamente, e associada à tripsina, sobre a caseína. O aumento da relação E:S de 2% para 4% para a subtilisina, usada isoladamente, apresentou alteração significativa em todas as frações, com um

decréscimo dos teores de grandes peptídios e aminoácidos livres, e um aumento do conteúdo de médios e também de di- e tripeptídeos. Porém, quando usaram a subtilisina associada à tripsina sobre a caseína, ao aumentar a relação E:S das enzimas de 2% para 4% para a subtilisina e de 10% para 20% para a tripsina, estes autores obtiveram uma alteração desvantajosa do perfil peptídico dos hidrolisados, uma vez que houve um decréscimo no conteúdo de di- e tripeptídeos enquanto que as outras frações mantiveram-se constantes. CARREIRA *et al* (2001b), ao utilizar a caseína como substrato, observaram que alterando-se a relação E:S da pepsina, nas mesmas proporções que a tripsina (de 2% para 4%), não houve diferença significativa nas frações F1, F2 e F4. Entretanto os autores observaram um aumento significativo na fração F3 (di- e tripeptídeos) de 2% para 10%. MORAIS *et al* (2002) aumentaram a relação E:S da papaína, de 2% para 4%, e obtiveram alterações em todas as frações cromatográficas, produzindo um hidrolisado de caseína com perfil nutricional de pior qualidade, com redução do teor de F3 de 20% para 9% e um aumento no teor de aminoácidos livres de 7% para 29%.

GONZÁLEZ-TELLO (1994), por outro lado, contradiz estes resultados quando afirma que uma alteração na relação E:S não exerce qualquer influência na distribuição de peptídios nas frações cromatográficas de hidrolisados protéicos. Existem relatos na literatura que confirmam esta observação. Assim, FREITAS *et al.* (1993) não obtiveram alteração do perfil cromatográfico de um hidrolisado de caseína, ao aumentar 3,7 vezes a concentração de pancreatina. Segundo os autores, este limite aparente na hidrólise da caseína, poderia estar relacionado, pelo menos em parte, à sua seqüência de aminoácidos e à especificidade das enzimas empregadas. Apesar destes resultados concordarem com a afirmação de GONZÁLEZ-TELLO (1994), uma explicação para isso seria a de que os suportes cromatográficos, empregados por FREITAS *et al.* (1993) foram ineficientes para a separação de peptídios, de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente de di- e tripeptídeos (KOPACIEWICZ e REGNIER, 1982; LEMIEUX *et al.*, 1991).

EFEITO DO TEMPO DE AÇÃO DAS ENZIMAS

AUMENTO DO TEMPO DE AÇÃO DE APENAS UMA ENZIMA (PROTEASE DO *ASPERGILLUS ORYZAE*)

O efeito do aumento do tempo na ação da AO sobre o leite em pó desnatado está apresentado na Figura 5. Mantendo-se o tempo total de reação em 25h, estudou-se o efeito do aumento do tempo da ação da AO, com a conseqüente redução do tempo de ação da PA.

Quando o tempo de atuação da AO foi aumentado de 5h (H3) para 15h (H4), nota-se uma pequena melhora no perfil peptídico, uma vez que o teor de grandes peptídios foi reduzido de 18,39% para 14,16%. Entretanto, não houve alteração significativa nos teores das outras frações (F2, F3 e F4).

MORATO *et al* (2000) estudaram o tempo de ação da subtilisina (de origem microbiana) e da tripsina sobre a caseína. Quando a subtilisina foi adicionada antes da tripsina, o aumento do tempo de ação da primeira enzima de 5min para 2h30m foi prejudicial, pois

ocasionou um aumento no teor de grandes peptídios e uma redução do conteúdo de di- e tripeptídeos, porém, o teor de aminoácidos livres manteve-se constante. Aumentando-se ainda mais o tempo de atuação da subtilisina, de 2h30m para 4h55m, melhorou o perfil peptídico, considerando-se a elevação do conteúdo de pequenos peptídios (de 12% para 19%).

Em outro estudo, sobre o aumento do tempo de ação de apenas uma das enzimas, CARREIRA *et al.*(2001a) alteraram a ordem de adição da pepsina e da tripsina, aumentando-se o tempo apenas da pepsina. Quando a pepsina foi adicionada antes da tripsina, o aumento do tempo de ação da pepsina de 2h para 3h, levou a um aumento nos teores de grandes peptídios e uma diminuição no conteúdo de médios peptídios e de aminoácidos livres. Os teores de di- e tripeptídeos não variou. Assim, o aumento do tempo de ação da pepsina não melhorou o perfil peptídico destes hidrolisados. Quando a tripsina foi adicionada antes da pepsina, houve, também, um efeito negativo no valor nutricional, uma vez que, o aumento do tempo de ação da pepsina de 2h para 3h levou a uma redução significativa no teor de di- e tripeptídeos (de 24% para 5%).

Estes resultados sugerem, que, nem sempre o aumento do tempo de ação da enzima pode ser benéfico para o perfil peptídico. Torna-se importante, um estudo detalhado para cada caso, avaliando-se também as vantagens e desvantagens do ponto de visto econômico.

AUMENTO DO TEMPO DE AÇÃO DAS DUAS ENZIMAS (PROTEASE DO *ASPERGILLUS ORYZAE* E DA PAPAÍNA)

O efeito do aumento do tempo na ação da AO e da PA sobre o perfil peptídico do leite em pó desnatado está apresentado na Figura 6. Observa-se que dobrando-se o tempo de ação das duas enzimas, de 1h para 2h (AO) e de 4h para 8h (PA), hidrolisados H1 e H2, respectivamente, não favoreceu o perfil peptídico, do ponto de vista nutricional, uma vez que levou a um aumento (em quase 40%) de aminoácidos livres, uma redução de médios peptídios e não houve alterações nos teores de grandes, e de di- e tripeptídeos. Aumentando-se, ainda mais, o tempo de ação das duas enzimas, de 2h para 5h (AO) e de 8h para 20h (PA), hidrolisados H2 e H3, respectivamente, produziu uma pequena melhora do perfil peptídico, já que houve uma redução dos teores de grandes peptídios. CARREIRA *et al.* (2001a) empregaram a pepsina e a tripsina na hidrólise da caseína. Estes autores mostraram que quando a pepsina foi adicionada antes da tripsina, o aumento no tempo de ação da pepsina de 1h para 2h e da tripsina de 2h para 3h, provocou uma redução nos teores de grandes peptídios, um aumento dos teores de médios peptídios e de aminoácidos livres e não houve diferença em relação aos níveis de di- e tripeptídeos. Nas outras condições estudadas, nas quais a pepsina foi a segunda enzima a atuar, o aumento de 1h para 2h no tempo de ação desta enzima e de 2h para 3h no tempo de ação da tripsina, não apresentou qualquer vantagem do ponto de vista nutricional, uma vez que resultou em uma elevação do teor de aminoácidos livres.

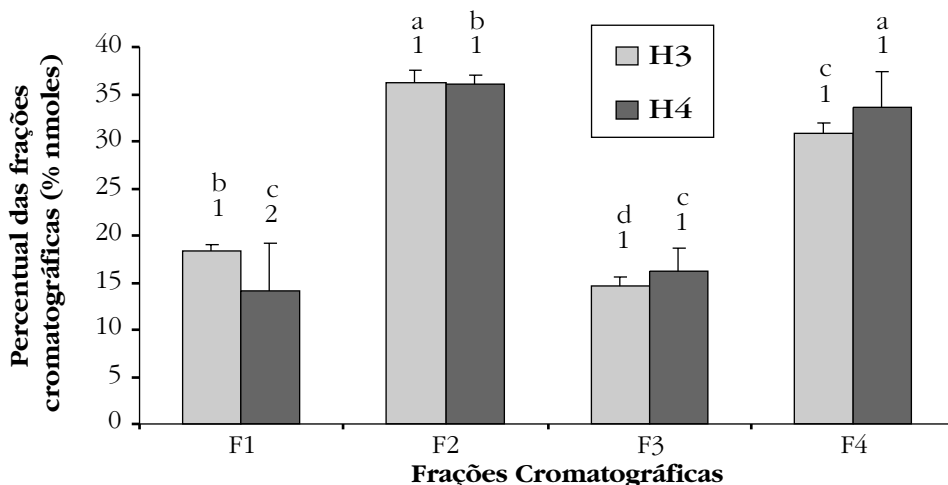


Figura 5: Teor de aminoácidos das frações cromatográficas de hidrolisados de leite em pó desnatado, obtidos da ação associada da protease do *Aspergillus oryzae* (AO) e da papaína (PA): efeito do aumento do tempo de ação da AO. H3: 25h (5h AO + 20h PA); H4: 25h (15h AO + 10h PA). F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livre. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado.

Estes resultados indicam que, pelo menos nestes casos, o aumento do tempo de ação das enzimas não produz melhora significativa no valor nutricional dos hidrolisados que, na maioria das vezes, é até reduzida. Além disso, um tempo de reação hidrolítica superior a 5h poderia favorecer a multiplicação microbiana (CHATAUD *et al.*, 1988; LOOSEN *et al.*, 1991).

CONCLUSÃO

A associação da protease do *Aspergillus oryzae* (AO) com a papaína (PA) mostrou ser ligeiramente mais vantajosa do que a utilização da AO isolada, tendo produzido um perfil peptídico mais adequado às necessidades de dietas especiais. Dentre as associações estudadas, a melhor refere-se à ação de AO por 1h seguida da PA por 4h. Considerando-se a semelhança do perfil peptídico obtido nesta associação com o obtido pela ação isolada da AO, este último tratamento, entretanto, apresenta-se mais vantajoso, do ponto de vista econômico.

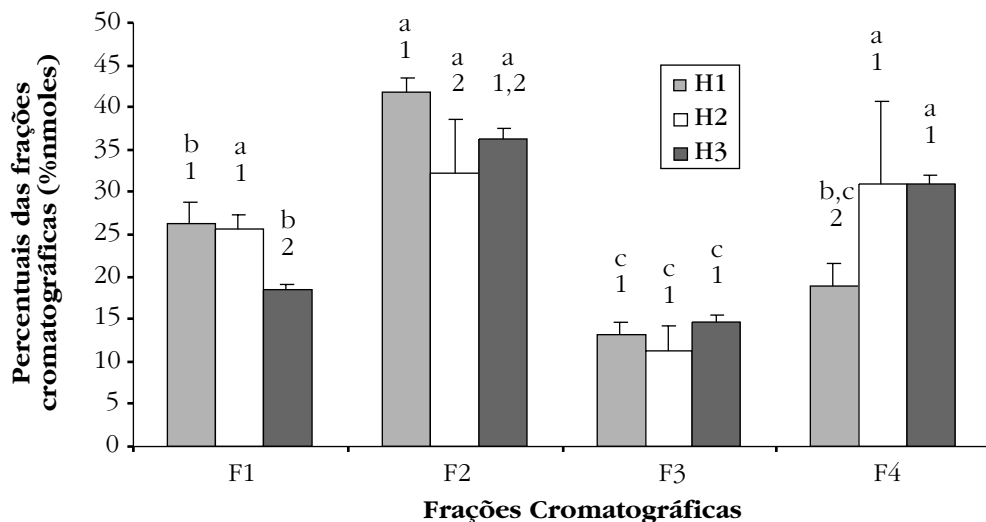


Figura 6 Teor de aminoácidos das frações cromatográficas de hidrolisados de leite em pó desnatado, obtidos da ação associada da protease do *Aspergillus oryzae* e da papaína: efeito do aumento tempo de ação das duas enzimas. H1: 5h (1h AO + 4h PA); H2: 10h (2h AO + 8h PA); H3: 25h (5h AO + 20h PA). F1: grandes peptídios (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídios (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livre. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- ADACHI, S.; KIMURA, Y.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI, H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, v.55, n.4, p.925-932, 1991.
- ADIBI, S.A.; MORSE, E.L. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J. Clin. Invest.*, v.50, p.2266-2275, 1971.
- ADIBI, S.A.; SOLEIMANPOUR, M. R. Functional characterization of dipeptide transport system in human jejunum. *J. Clin. Invest.* v.53, p.1368-1374, 1974.
- ARMSTEAD, I.P.; LING, J.R. Chromatographic separation of mixed peptides from amino acids in biological digests with volatile buffers. *J. Chromatogr.*, v.586, n.3, p.259-263, 1991.
- AUBRY, A.F.; CAUDE, M.; ROSSET, R. Separation and identification of dipeptides in an hydrolyzed brain extract. *Chromatogr.*, v.33, n.3, p.533-538, 1992.
- BOZA, J.J.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; GIL, A. Nutritional and antigenic characterization of enzymatic whey protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, v.43, n.4, p.872-875, 1995.

- CÂNDIDO, L.M.B. Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do nilo (*Oreochromus niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais. Campinas: UNICAMP, 1998. Tese. (Doutorado em Ciência de Alimentos). UNICAMP.
- CARREIRA R.L.; MORAIS, H.A.; BARBOSA, C.M.S.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teores de pequenos peptídeos: associação da pepsina, tripsina e subtilisina. *Braz. J. Food. Tech.*, v.4, n.5, p.103-108, 2001a.
- CARREIRA R.L.; ORNELLAS, C.B.D.; MORAIS, H.A.; MOTTA, S.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M. P. C. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. *Arch. Lat. Am. Nut.* 2001b (submetido para publicação).
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Sci. Techn.*, v.11, 2000.
- CHATAUD, J.; DESREUMEUX, S.; CARTWRIGHT, T., Procédé de fabrication d'un hydrolysat enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1. 14/12/1987, 20/07/1988. Neuilly-sur-Seine-FR: Laboratório Roger Bellon, 1988.
- DAVIS, M.; LEE, T.D. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: a practical guide to small-scale separations. *Prot. Sci.*, v.1, p.935-944, 1992.
- ETZEL, M.R.; MADISON, W. Production of kappa-casein macropeptide for nutraceutical uses., *Patents US 5968586, A23J1/2; A23C 9/14; C12C 3/08; A23P 1/00.* 09/10/1997; 19/10/1999. Madison, WI: Winsconsin Alimni Reserch Foundation, 1999.
- FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; 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, n.8, p.1432-1438, 1993.
- FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Techn.*, v.48, n.10, p.86-88, 1994.
- GALLAGHER, J.; KANEKIAN, A.D.; EVANS, E.P. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v.29, n.3, p.279-285, 1994.
- GOLOVCHENKO, N.; KATAEVA, I.A.; AKIMENKO, V. K. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J. Chromatogr.*, v.591, n.4, p.121-128, 1992.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 13 ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 476 p.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PAÉZ, M.P.; GUADIX, E.M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range, *Biotech. Bioeng.*, v.44, n.4, p.529-532, 1994.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI JUNIOR., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v.71, p.65-69, 1986.
- KASAI, T.; SAKAMAKI, T.; KIRIYAMA, S. Modified process for preparation of ozonated casein and nutritional evaluation of the product with rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.58, n.3, p.451 - 454, 1994.
- KEOHANE, P.P.; GRIMBLE, G.K.; BROWN, B.; SPILLER, R.C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut.*, v.26, p.907-913, 1985.

- KITAGAWA, T.; OWADA, M.; AOKI, K.; ARAI, S.; OURA, T.; MATSUDA, I.; IGARASHI, Y.; TADA, K.; KATAYAMA, S.; HASHIDA, W. Treatment of phenylketonuria with a formula consisting of low - phenylalanine peptide. *Enzyme* v.38, p.321-327, 1987.
- KOPACIEWICZ, W.; REGNIER, F.E. Nonideal size-exclusion chromatography of proteins: effects of pH at low ionic strength. *Anal. Biochem.*, v.126, n.13, p.8-16, 1982.
- LEMIEUX, L.; AMIOT, J. Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates. *J. Chromatogr.*, v.73, n.1, p.189-206, 1990.
- LEMIEUX, L.; PIOT, J.M.; GUILLOCHON, D.; AMIOT, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J.Chromatogr.*, v.32, n.3, p.499-504, 1991.
- LENIER, I.E. The sulfhydryl proteases. In: WHITAKER, J.R. *Food related enzymes*. Washington: American Chemistry Society, 1974. 374p. *Advances in Chemistry Series* 136.
- LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V.; MOLLÉ, D.; PEZZENEC, S.; BOUHALLAB, S. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *J. Chromatogr. A*, v.881, p.1 - 21, 2000.
- LOOSEN, P.C.; BRESSPOLLIER, P.R.; JULIEEN, A.R.; PEJOAN, C.H.; VERNEUIL, B. *Procede pour preparer um hydrolysat enzymatique*. Tessenderlo Cheemie n. v.[BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tessenderlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18; A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001; W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUIA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.*, v.56, n.4, p.938-942, 1991.
- MORAIS H. A.; BARBOSA, C.M.S.; LOPES, D.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; SILVESTRE, M.P.C. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína. *Arch. Lat. Am. Nut.* v.52, n.1, p.77-83, 2002.
- MORATO, A.F.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J.Food Comp. and Anal.*, v.13, p.843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. *Applied Biochem. Microb.*, v.29, n.3, p.302-306, 1993.
- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. *Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.* Helsinki, Finland: Valio Oy, 1996.
- PARRADO, J.; MILLAN, F.; HERNANDEZ-PINZÓN; BAUTISTA, J.; MACHADO, A. Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v.41, n.11, p.1821-1825, 1993.
- PEREA, A.; UGALDE, U.; RODRIGUEZ, I.; SERRA, J.L. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. *Enz. Microb. Technol.*, v.15, n.11, p.418-423, 1993.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2nded. New York: Academic Press, 1975. 573p.

- SCHMIDT, D. G., POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Netb. Milk Dairy J.*, v.45, n.4, p.225-240, 1991.
- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, v.42, n.12, p.2778-82, 1994a.
- SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v.42, n.12, p.2783-2789, 1994b.
- SMITHERS, G.W.; BRADFORD, R.S. New casein products: fresh opportunities for the dairy industry. *Food Res. Quart.*, v.51, n.1, p.92-98, 1991.
- SNOWIEWICKI, J.; JAGIELKA, R.; SHAHIDI, F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. *Food Chem.*, v.57, n.3, p.435-439, 1996.
- TESMER, E.; VETTER, M.; RAFFLER, G.; SCHWEIKHARDT, F. Process of making phenylalanine-free food for infants and small children. *Patents* US 1996000682627, A23L 1/305, A23L 1/304; 09/10/1996; 07/04/1998. Friedrichsdorf, Germany: Milupa GmbH & Co. KG, 1998.
- VERNEUIL, B.; BRESSOLIER, P.H.; JULIEN, R. Quantification of amino acids, and di- and tripeptides in nutritional interest protein hydrolysates by ligand exchange chromatography in combination with Edman degradation. *Symposium on purification technologies*, 4th, 1990, p.253-258.
- VISSER, S.; SLAGEN, C.J.; ROBBEN, A.J.P.M. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, v.599, n.2, p.205-209, 1992.
- ZHANG, Y.; DORJPALAM, B.; HO, C.T. Contribution of peptides to volatile formation in the Maillard reaction of casein hydrolysate with glucose. *J. Agric. Food Chem.*, v.40, n.5, p.2467-2471, 1992.

Recebido para publicação em 26/07/02. Aprovado em 06/12/02.

Estimativa do consumo de EDTA em escolares

Assessment of EDTA intake in schoolchildren

ABSTRACT

FISBERG, R.M.; TORRES, E.A. F.S.; MORIMOTO, J.M.; FISBERG, M.; ARAYA L., H.; VERA A., G.; TOSTADO, E.C.; LOYOLA, M.A.A.; GARCÍA, O.P.; ALMEIDA, N.; Assessment of EDTA intake in schoolchildren. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP, v.24, p.71-83, dez., 2002.

EDTA is an additive used in different food products. Current information on EDTA consumption by different Latin American populations is not available. The purpose of this study was to descriptively evaluate EDTA intake in Brazilian, Chilean and Mexican schoolchildren. A total of 677 children (355 Brazilians, 204 Mexicans and 118 Chileans) from 6 to 13 years of age and attending private schools participated in this study. The food additive intake was evaluated in Brazil and Chile using a 24-hour dietary recall and in Mexico by a food frequency questionnaire. In Brazil, the main food source of EDTA was margarine (30 %), followed by mayonnaise (24%) and salad dressings (23 %). In Chile, intake of EDTA sources came from soda drinks (63 %) followed by juices (14 %). In Mexico, EDTA intake in school children came mainly from flavored beverages (52 %), juices (23 %) and soft drinks (20 %). EDTA intake was 0,18 mg/kg/day in Brazil; 0,40 mg/kg/day in Chile and 0,48 mg/kg/day in Mexico. In all countries studied, the levels consumed fell below the accepted daily intake level of 2.5mg/Kg of body weight/day (FAO/WHO, 1995).

Keywords: EDTA, food additive, school children, acceptable daily intake

REGINA MARA FISBERG¹,
ELIZABETH APARECIDA
FERRAZ DA SILVA
TORRES¹, JULIANA
MASAMI MORIMOTO²,
MAURO FISBERG³,
HÉCTOR ARAYA L.⁴,
GLORIA VERA A.⁴,
EDUARDO CASTAÑO
TOSTADO⁵, MIRIAM
ARACELY ANAYA
LOYOLA⁵, OLGA P.
GARCÍA⁶, NELSON
ALMEIDA⁶.

^{1,2}Depto. de Nutrição, Fac. de Saúde Pública, Univ. de São Paulo.

²Fac. de Saúde Pública, Univ. de São Paulo

³Centro de Estudos e Pesquisa em Saúde e Nutrição, Univ. São Marcos e Depto. de Pediatria, Unifesp.

⁴Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

⁵Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, México.

⁶W. K. Kellogg Institute, EUA

Endereço para correspondência:
Regina Mara Fisberg:
Av. Dr. Arnaldo, 715
Cerqueira César
São Paulo – SP – Brasil
CEP 01246-984.
E-mail: rfisberg@usp.br

RESUMEN

El EDTA se utiliza como aditivo en diferentes productos alimenticios. Actualmente no existe información sobre el consumo de EDTA en poblaciones de diferentes países de América Latina. El objetivo del estudio fue evaluar de forma descriptiva la ingestión de EDTA de niños escolares brasileños, chilenos y mexicanos. Un total de 677 niños (355 brasileños, 204 mexicanos y 118 chilenos) entre 6 y 13 años de edad de escuelas privadas participaron en el estudio. La ingesta del aditivo fue evaluada en Brasil y en Chile por medio de un recordatorio de 24 horas y en México utilizando un cuestionario de frecuencia de consumo. En Brasil, la principal fuente de EDTA fue la margarina (30%), seguido de la mayonesa (24%) y aderezos para ensaladas (23%). En Chile, las fuentes de EDTA de mayor consumo fueron las bebidas gaseosas (63%), seguidas de jugos embotellados (14%). En México, el consumo de EDTA en escolares proviene principalmente de bebidas sin gas (52%), jugos embotellados (23%) y bebidas gaseosas (20%). La ingesta de EDTA por kilogramo de peso por día fue 0,18 mg/kg/día en el Brasil, de 0,40 mg/kg/día en Chile y de 0,48 mg/kg/día en México. En los tres países evaluados, los niveles de consumo estuvieron por debajo del nivel de ingesta diaria aceptable de FAO/WHO (1995) de 2,5 mg/kg de peso corporal/día.

Palabras-clave: EDTA, aditivo alimentario, niños escolares, ingesta diaria aceptable

RESUMO

O EDTA é utilizado como aditivo em diferentes alimentos. Atualmente não existe informação sobre o consumo de EDTA em populações de diferentes países da América Latina. O objetivo do presente estudo foi avaliar de forma descriptiva o consumo de EDTA em escolares brasileiros, chilenos e mexicanos. Um total de 677 crianças (355 brasileiros, 204 mexicanos e 118 chilenos) entre 6 e 13 anos de idade, de escolas privadas, participaram do estudo. A ingestão do aditivo foi avaliada no Brasil e no Chile através de um recordatório de 24 horas e no México utilizando um questionário de frequência alimentar. No Brasil, a principal fonte de EDTA foi a margarina (30%), seguida da maionese (24%) e molhos para saladas (23%). No Chile, as fontes de EDTA de maior consumo foram as bebidas gasosas (63%), seguidas de sucos engarrafados (14%). No México, o consumo de EDTA, em escolares, foi proveniente principalmente de bebidas sem gás (52%), sucos engarrafados (23%) e bebidas com gás (20%). O consumo de EDTA por quilograma de peso por dia foi 0,18 mg/kg/dia no Brasil, de 0,40 mg/kg/dia no Chile e de 0,48 mg/kg/dia no México. Em todos os países estudados, os níveis encontravam-se abaixo do nível de ingestão diária aceitável da FAO/WHO (1995) de 2,5 mg/kg de peso corporal/dia.

Palavras-chave: EDTA, aditivos alimentares, escolares, ingestão diária aceitável

INTRODUÇÃO

O EDTA é um aditivo utilizado nos alimentos como antioxidante, conservante, sinergista ou sequestrante, na forma de seus sais - dissódico (etilenodiaminotetraacetato dissódico) e cálcio dissódico (etilenodiaminotetraacetato de cálcio e dissódico).

Pela legislação brasileira seu uso é recomendado e aprovado em limites definidos, de acordo com o tipo de alimento (Quadro 1).

Do ponto de vista toxicológico, existe a determinação da ingestão diária aceitável (IDA) de EDTA recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1995a) de até 2,5 mg/kg de peso/dia. Portanto, quanto menor for o peso do indivíduo, menor deverá ser o seu consumo de EDTA por meio dos alimentos, o que implica em que o grupo de maior exposição seja o de indivíduos em idade escolar. O Quadro 2 apresenta a estimativa para crianças de 6 a 11 anos, nos percentis 10, 50 e 90 de peso para idade – segundo o *National Center for Health Statistics* - NCHS (OMS, 1995b) – de quanto poderiam estar ingerindo diariamente de EDTA.

Os sais de ferro de EDTA vêm sendo utilizados na fortificação de alimentos a fim de combater deficiências nutricionais. O complexo NaFeEDTA pode ser uma boa escolha devido à sua biodisponibilidade, ainda que na presença de inibidores de ferro. Provavelmente, a ação do EDTA seja de manter o ferro na forma Fe III com o aumento do pH, diminuindo ao máximo a chance de sua redução pelo ácido ascórbico e facilitando seu uso em produtos farmacêuticos ou alimentícios (HEIMBACH *et al*, 2000; WHITTAKER *et al*, 1993).

Em uma recente revisão sobre a prevenção da deficiência de ferro através da fortificação, HURREL (1997) destaca sua importância em países em desenvolvimento, bem como a maneira e o tipo de ferro a ser utilizado.

Nos países latino-americanos, como Brasil, Chile e México, não existe informação sobre a quantidade consumida deste aditivo através dos alimentos. Esta é necessária com a finalidade de estabelecer intervalos de segurança para os usos adicionais de sais de EDTA, como o sal de ferro EDTA (NaFeEDTA) na fortificação de alimentos.

Por outro lado, a diversidade da nossa sociedade torna complexa e de alto custo a estimativa desta ingestão pela população, implicando na necessidade de realizar, inicialmente, estudos descritivos que gerem dados básicos para posteriores estudos de inferência.

Como base inicial de referência, parte-se de que crianças de níveis socioeconômicos elevados são as que consomem em sua dieta uma maior proporção de produtos manufaturados, entre os quais se encontram os alimentos que, de maneira potencial, usam em sua formulação alguma das formas de EDTA como conservante, sendo consideradas como a população de maior risco. Assim, o objetivo deste estudo foi de estimar a quantidade de consumo do EDTA, em escolares de nível socioeconômico médio/alto.

Quadro 1 Categoria de alimentos e a respectiva quantidade máxima de EDTA permitida segundo a legislação brasileira, com a função de sequestrante (BRASIL, 2001; BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b; BRASIL, 1999c; BRASIL, 1988)

Aditivo	Categoria de Alimentos	Quantidade máxima permitida (g/100g)
EDTA cálcio dissódico (etilenodiaminotetra acetato de cálcio e dissódico) (INS 385)	Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, prontas para o consumo e preparados líquidos	0,0035*
	Molhos emulsionados (incluindo molhos a base de maionese) e não emulsionados, mostarda de mesa, catchup, maionese, molhos desidratados, condimentos preparados	0,0075*
	Sopas e caldos, prontos para consumo e desidratados	0,0075*
	Goma de mascar ou chicle	0,01
	Água gaseificada	0,0033
	Creme vegetal	0,01
	Cogumelos em conserva	0,02
	Gorduras e compostos gordurosos	0,01
	Hortaliças em conservas (batata)	0,01
	Hortaliças em conservas (feijão fradinho)	0,015
	Margarinas	0,01
EDTA dissódico (etilenodiaminotetra acetato dissódico) (INS 386)	Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, prontas para o consumo e preparados líquidos	0,0035*
	Sopas e caldos, prontos para consumo e desidratados	0,0075*
	Goma de mascar ou chicle	0,01
	Cogumelos em conserva	0,02
	Hortaliças em conservas (batatas)	0,01
	Hortaliças em conservas (feijão fradinho)	0,015
	Produtos de frutas	0,01

*produto pronto a ser consumido

METODOLOGIA

Para estimar a quantidade de EDTA consumida por escolares compilaram-se dados de 3 estudos e foram construídos, a partir desses, gráficos para facilitar a análise dos resultados.

Os países analisados foram: Chile, México e Brasil.

Quadro 2 Ingestão diária aceitável (IDA) de EDTA recomendada pela FAO/WHO, segundo idade, sexo e percentil 10, 50 e 90 de peso para idade

Idade	Sexo	Quantidade de EDTA (mg/dia)		
		PP/I * 10	PP/I * 50	PP/I * 90
6	M	20,69	51,72	61,25
7	M	22,85	57,12	69,00
8	M	25,30	63,25	73,25
9	M	28,13	70,32	89,25
10	M	31,44	78,60	102,00
11	M	35,30	88,25	124,00
6	F	19,52	48,80	59,50
7	F	21,84	54,60	68,00
8	F	24,84	62,10	79,25
9	F	28,46	71,15	93,00
10	F	32,55	81,37	108,00
11	F	36,95	92,37	123,50

* PP/I = percentil de peso para idade

FONTE DE DADOS

As principais características referentes a cada pesquisa são descritas abaixo.

Brasil. Foram avaliados 355 escolares na faixa etária de 6 a 11 anos, que frequentam escolas particulares de nível socioeconômico médio/alto no município de São Paulo. O consumo alimentar de EDTA foi avaliado por meio do método do recordatório de 24 horas, em instrumento próprio elaborado para atender os propósitos do estudo. O inquérito foi realizado por meio da apresentação das embalagens dos produtos que continham EDTA em sua formulação e de outros selecionados como controle. Foram obtidas informações sobre os alimentos, ingeridos no dia anterior, que continham o aditivo em sua formulação, suas quantidades e o tipo de preparação. A estimativa deste consumo foi realizada através da porção usual de alimento ingerido (PHILIPPI *et al*, 1996), multiplicada pela quantidade do aditivo contida no mesmo. A quantidade de EDTA não foi fornecida pelas empresas, o que tornou necessária uma estimativa desta quantidade de acordo com a máxima permitida pela legislação (GIBNEY e LAMBE, 1996). Foi somado o consumo de sais de EDTA provenientes de todos os alimentos no dia da criança. Para o processamento e análise dos dados foi utilizado o aplicativo EPI INFO versão 6.02 (DEAN *et al*, 1994).

Chile. O estudo foi realizado com 118 escolares de ambos os sexos, na faixa etária de 6 a 11 anos, frequentadores de escolas de nível socioeconômico médio e médio alto.

O consumo de EDTA foi avaliado por meio do recordatório de 24 horas com vistas aos alimentos que continham o referido aditivo em sua formulação. O valor médio dos sais de EDTA contido em cada alimento foi multiplicado pela quantidade de alimento ingerido, obtendo-se o consumo de sais de EDTA para cada criança. Posteriormente, foram somadas as quantidades de EDTA proveniente de todos os alimentos por dia para cada criança.

México. Foram avaliados 204 escolares de ambos os sexos na faixa etária de 6 a 13 anos, freqüentadores de escolas de nível socioeconômico médio e médio alto. A estimativa do consumo de EDTA pelos escolares foi realizada por meio do questionário de freqüência alimentar, com vistas aos alimentos que utilizam o referido aditivo em sua formulação. O questionário foi aplicado nas crianças e também em suas mães. Para estimar a disponibilidade de EDTA *per capita* no mercado nacional foram verificados os dados oficiais da balança comercial mexicana, para obter as quantidades de importação e exportação do aditivo ou produtos que o contenham.

RESULTADOS

No Brasil, Chile e México o EDTA não é fabricado, tornando necessária a importação deste aditivo por parte destes países. Dados sobre valores de importação de EDTA no México são apresentados através de dados oficiais da Secretaria de Comércio e Fomento Industrial Mexicana, nos quais pode se observar que este país é um exportador decrescente de compostos aminados com funções oxigenadoras do tipo do EDTA, enquanto a importação de ácidos etilenodiaminotri ou tetracetato e seus sais nos últimos dois anos tem aumentado de maneira excepcional, tanto do tipo alimentar como os que não o são. Entretanto, supondo que as importações de ácidos etilenodiaminotri ou tetracetatos e seus sais são dirigidas totalmente à indústria de alimentos e estimando um custo médio de 10 a 12 dólares (dados extra oficiais de fornecedores no México), pode-se estimar que o país utilizou em 1997 em torno de 180 toneladas. Estimando-se a população mexicana em 1995 por INEGI era de 91.158.290 habitantes, a disponibilidade *per capita* do produto importado seria de 0,05 mg/dia aproximadamente. Esta disponibilidade seria muito baixa e, por isso, não foi possível levar em consideração, pois devem ser inúmeras as causas para esta subestimação.

No Brasil, o EDTA é utilizado em apenas alguns produtos alimentícios como antioxidante ou seqüestrante, que são eles: maioneses, exceção feita a apenas 1 marca comercial; margarinas, cremes vegetais e halvarinas, na maioria das marcas comerciais; uma pasta de queijo e uma marca de molho para saladas. Os produtos são de custo acessível, com exceção feita aos molhos para salada, consumidos prioritariamente pela população de nível socioeconômico médio alto e alto. No México, uma pequena proporção de alimentos declara o uso de EDTA, significando baixa utilização ou omissão deste tipo de informação por questões diversas. Os alimentos que usam o EDTA em sua formulação são molhos para salada, de seis marcas comerciais; mostardas de duas marcas comerciais; maioneses, três marcas comerciais; feijões enlatados, 1 marca comercial; bebidas refrescantes sem gás; refrescos, sucos engarrafados, catchup. No Chile, o EDTA é

encontrado como parte da formulação em bebidas gasosas, sucos, margarina, maionese, mostarda, catchup, molhos para tempero, picles, crustáceos e moluscos em conserva. Porém, neste estudo, as marcas comerciais dos produtos não foram relacionadas.

Tabela 1 Distribuição percentual do consumo de alimentos que contêm EDTA no Brasil e no México

Alimento	País	
	Brasil (%)	México (%)
Margarina	29,7	—
Maionese	24,3	—
Molho para salada	22,6	—
Halvarina	15,9	—
Creme Vegetal	5,0	—
Pasta de queijo	2,5	—
Bebidas refrescantes sem gás	—	51,6
Sucos engarrafados (embotellados)	—	23,4
Refrescos	—	19,7
Catchup, Maionese e Mostarda	—	5,3
Total	100	100

Ao compararmos o Brasil e o México em relação à participação percentual de alimentos que contêm EDTA no consumo total (Tabela 1), pode-se observar apenas um alimento em comum entre os dois países que contém o aditivo, sendo este a maionese. Porém, não foi possível fazer uma comparação deste consumo entre os dois países, pois no México o consumo de maionese foi somado ao de catchup e mostarda (produtos que não contêm o aditivo no Brasil), enquanto que no estudo brasileiro a ingestão de cada alimento está demonstrada separadamente. No Brasil, o alimento que contém o aditivo com maior consumo entre os escolares foi a margarina (29,7%), seguida da maionese (24,3%) e do molho para salada (22,6%), estes dois com percentuais bastante próximos. Porém, no México, o consumo de mais de 50% dos escolares foi representado pelas bebidas refrescantes sem gás (51,6%).

Na Tabela 2, pode se observar que apenas a maionese e a margarina são comuns entre os produtos do Brasil e no Chile que contém EDTA. No primeiro, a maionese representou 15% do consumo total do dia, enquanto que a margarina teve uma participação de 6,9%. Entre os chilenos, a maionese teve um percentual de 9,4% e a margarina, de 8,7%. O alimento que teve maior participação no total do dia das crianças do Brasil foi o molho para salada (59,6%), já no Chile, foram as bebidas com gás que tiveram maior consumo (63,1%).

No Brasil, 123 escolares foram avaliados quanto ao consumo de cereal matinal de milho, dentre os quais, 52,9% consumiam o produto. A Tabela 3 apresenta a estimativa de consumo de EDTA por uma criança de 6 anos a partir do pressuposto de que todos os produtos que contêm EDTA tenham sido consumidos em um mesmo dia. Para o cálculo, somamos todos os produtos referidos, com as quantidades médias por porção, exceção feita ao creme vegetal e à halvarina, que são substitutos da margarina. O valor do consumo de EDTA contido no cereal matinal de milho foi incluído aqui separadamente pois este alimento não estava entre os pesquisados no México e Chile. Os valores encontrados representam cerca de 30% da ingestão diária aceitável.

Tabela 2 Quantidade média de consumo de EDTA por produto no Brasil e no Chile

Produto	Brasil			Chile		
	Quantidade média de EDTA (mg/dia)	DP	% do total	Quantidade média de EDTA (mg/dia)	DP	% do total
Molho para Salada	8,44	0,00	59,6	—	—	—
Maionese	2,13	1,48	15,0	1,21	1,71	9,4
Margarina	0,97	0,14	6,9	1,12	0,89	8,7
Creme Vegetal	0,95	0,17	6,7	—	—	—
Halvarina	0,94	0,19	6,6	—	—	—
Pasta de Queijo	0,73	0,30	5,2	—	—	—
Bebidas com gás	—	—	—	8,11	13,49	63,1
Sucos	—	—	—	1,82	3,02	14,2
Outros*	—	—	—	0,54	0,99	4,2
Mostarda	—	—	—	0,05	0,14	0,4
Total	14,16	2,28	100	12,85	20,24	100

*Outros: Mariscos, molhos para tempero, maionese, mostarda, catchup e pickles incluídos em preparações do almoço ou jantar

O Quadro 3 apresenta o consumo de EDTA por quilograma de peso e por dia nos três países. O Brasil é o país com menor consumo do aditivo por criança (0,18 mg/kg/dia), seguido pelo Chile (0,40 mg/kg/dia) e pelo México (0,48 mg/kg/dia), que teve a maior estimativa de consumo de EDTA. Deve-se ressaltar que o consumo do Brasil é uma simulação de que a mesma criança teria ingerido todos os produtos que contêm EDTA num mesmo dia, considerando a média de peso no percentil 50 de peso para idade de meninos (RENEWICK, 1996).

No estudo realizado no México, os dados sobre o consumo de produtos que continham EDTA em sua formulação foram obtidos através de questionário aplicado às crianças e às mães. A ingestão do aditivo estimada através do processamento dos dados

Tabela 3 Estimativa de consumo de EDTA por um escolar com 6 anos de idade, no Brasil

Produto	Quantidade média de EDTA (por porção em mg)	%IDA	
		M	F
Molho para salada	8,44	16,3	17,3
Maionese	2,13	4,1	4,4
Margarina	0,97	1,9	1,9
Pasta de Queijo	0,73	1,4	1,5
Cereal Matinal de Milho	3,00	5,8	6,2
Total	15,27	29,5	31,3

*Presupõe-se que todos os produtos contendo EDTA sejam consumidos em um mesmo dia

Quadro 3 Comparação entre o consumo médio de EDTA por quilograma de peso e a porcentagem da IDA, no Brasil, Chile e México

País	EDTA % (mg/kg/dia)	IDA ¹
Brasil	0,18	7,2
Chile	0,40	16,0
México	0,48	19,2

1 - Ingestão Diária Aceitável = 2,5 mg/kg de peso/dia

Tabela 4 Estimativa do consumo de EDTA segundo informações fornecidas pelas mães dos escolares mexicanos

Alimento	%
Bebidas refrescantes sem gás	30,1
Bebidas com gás	27,2
Sucos engarrafados	20,1
Manteiga, margarina, maionese, mostarda e marmelada	13,0
Feijão enlatado	7,3
Total	97,7

obtidos das mães foi de 0,27 mg/kg de peso corporal/dia, o que representa um pouco mais de 10% da IDA. As contribuições mais importantes para esta estimativa provêm dos seguintes alimentos (Tabela 4): bebidas refrescantes sem gás, 30,1%; sucos engarrafados 20,1%; bebidas com gás, 27,2%; manteiga, margarina, maionese, mostarda e marmelada, 13,0%; e feijões enlatados, 7,3%. Com estes valores, pode se observar que os dados

obtidos das crianças apresentaram uma estimativa maior de ingestão do EDTA do que o valor fornecido pelas mães. A justificativa para este fato seria de que o questionário aplicado nos escolares focalizava só alguns alimentos (aqueles que continham o aditivo), o que influencia a criança a exagerar a informação de consumo destes; já o questionário das mães, tinha um maior número de alimentos podendo se observar a freqüência no contexto habitual da alimentação. Adicionalmente se analisaram os dados obtidos das mães para se determinar a relação entre freqüência de consumo e alimentos mediante a técnica estatística de Análise por Correspondência (GREENACRE, 1987). Esta análise é uma técnica estatística para se mostrar graficamente as associações entre os alimentos e a freqüência de consumo. Pôde se observar que os alimentos que são atualmente regulamentados para a adição de EDTA são de freqüência de consumo muito baixa.

DISCUSSÃO

O aditivo é importado pelo Brasil, México e Chile, o que torna seu custo inviável para utilização em muitos produtos alimentícios. Dos alimentos referidos como consumidos pelas crianças, no Brasil os mais comuns são a margarina e maionese, pois o molho para salada não é um produto utilizado pela população em geral devido ao seu custo e não faz parte do consumo habitual na faixa etária em questão. O molho para salada foi o produto que apresentou a maior quantidade média consumida devido à alta concentração de EDTA por grama de produto. No México, o maior consumo referido foi das bebidas refrescantes sem gás e já no Chile, foram as bebidas gasosas que tiveram maior consumo.

Nos três países, os estudos foram realizados em crianças pois a chance de que a IDA de um determinado aditivo seja ultrapassada é maior neste grupo do que em outros. Isto se explica pelo fato de as crianças terem a mais alta média de ingestão de energia por kg de peso por dia e a IDA ser expressa com base no peso corporal (LÖWIK, 1996).

Nos estudos realizados no Brasil e no Chile, o método do recordatório de 24h foi escolhido para avaliar o consumo do aditivo apesar da possibilidade de subestimar ou superestimar o consumo de aditivos em função do número limitado de dias (LÖWIK, 1996). Entretanto, após a identificação pelos pesquisadores do pequeno número de alimentos que contém o aditivo e na maioria das vezes serem produtos consumidos em pequenas quantidades, como é o caso das margarinas, optamos pelo recordatório de 24h que é um método rápido e de baixo custo. Já o estudo realizado pelos mexicanos utilizou o questionário de freqüência alimentar por ser um método de custo baixo, simples e que pode ser preenchido pelo próprio entrevistado, fornecendo como resultado uma estimativa da porcentagem de consumidores (GIBNEY, 1999).

Os dados obtidos em nosso estudo em relação a ingestão de EDTA por quilograma de peso por dia foi inferior à ingestão diária aceitável. No Brasil a estimativa de consumo do EDTA de 0,18 mg/kg/dia corresponde a um valor aproximadamente 14 vezes menor do que a IDA (7,2%). Já o Chile registrou o consumo em torno de 16%, 6 vezes menor do que a IDA (0,40mg/kg/dia), seguido do México que teve a maior estimativa de consumo

de EDTA, atingindo 0,48 mg/kg/dia, o que representa cerca de 19% da ingestão diária recomendada (4 vezes menor do que a IDA). Desta forma, não julgamos necessária a avaliação do consumo alimentar mais acurada em função do valor encontrado estar muito abaixo da IDA (GIBNEY, 1999; LOWIK, 1996). Em nenhum dos três países o consumo atingiu os limites propostos pela FAO/OMS, o que demonstra que o consumo do EDTA é seguro diante dos atuais parâmetros recomendados aplicados na população.

Estudo realizado na população americana, verificou que os valores de ingestão no percentil 90 de alimentos fortificados com sais de ferro EDTA foram de 1,02 mg de EDTA/kg de peso/dia em adultos e para crianças com idade entre 1 a 6 anos de 1,93 mg de EDTA/kg de peso/dia, o que representa 41% e 77% da IDA, respectivamente. Este cálculo de ingestão dos sais de ferro EDTA, além de estar abaixo do parâmetro recomendado, está superestimado como no nosso estudo, uma vez que para análise de ingestão dos sais de ferro EDTA foram considerados os conteúdos máximos nos produtos alimentícios disponíveis (HEIMBACH *et al*, 2000).

A anemia ferropriva é, atualmente, a carência nutricional de maior prevalência no mundo, atingindo aproximadamente 1 bilhão de indivíduos. Os estudos realizados nos Estados Unidos e pela Organização Mundial de Saúde revelam que esta doença é a principal causa de distúrbios de saúde e perda da capacidade de trabalho, levando, conseqüentemente, ao deficit econômico.

Estudos realizados em São Paulo por SIGULEM *et al* (1978), MONTEIRO e SZARFAC (1987), TORRES *et al* (1994), FISBERG *et al* (1995) e MONTEIRO *et al* (2000) evidenciaram índices alarmantes de prevalência de anemia em crianças menores de 5 anos.

A fortificação alimentar tem sido vista como a melhor estratégia no combate à anemia, uma vez que o alimento escolhido pode atingir diretamente o público alvo e não depende da colaboração da população escolhida. A dificuldade encontrada na fortificação de alimentos com ferro consiste na escolha do sal de ferro, que deve ter como características não alterar o sabor; a cor e sofrer a menor interferência com os demais componentes do alimento.

Nossa preocupação é a oferta no mercado de produtos fortificados com substâncias das quais possam constituir em risco para a população infantil.

CONCLUSÃO

No Brasil, Chile e México o EDTA não é fabricado, sendo necessária a importação deste aditivo por parte destes países. Os alimentos que são atualmente regulamentados para adição de EDTA são de freqüência de consumo muito baixa.

O estudo realizado permite concluir que na amostra estudada o consumo médio de EDTA se encontra em níveis mais baixos do que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) proposta pela FAO/OMS, o que demonstra que o consumo do EDTA é seguro diante dos atuais parâmetros recomendados aplicados na população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Nº 33, de 9 de março de 2001: Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 12 – Sopas e caldos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 de março de 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Nº 382, de 5 de agosto de 1999: Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 13 – Molhos e condimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 9 de agosto de 1999a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Nº 387, de 5 de agosto de 1999: Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 5 – Balas, confeitos, bombons, chocolates e similares. *Diário Oficial da União*, Brasília, 9 de agosto de 1999b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Nº 389, de 5 de agosto de 1999: Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 16.2.2 – Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas. *Diário Oficial da União*, Brasília, 9 de agosto de 1999c.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 04, de 24 de novembro de 1988: aprova a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, II, VII, todas do Decreto Nº 55.871, de 26 de março de 1995. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 de dezembro de 1988.
- DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; CULOMBIER, D. *Epi Info, version 6: a word processing data-base and statistics program for epidemiology on microcomputers*. Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, 1994.
- FISBERG, M.; FERREIRA, A.M.A.; TADDEY, J.A.C.; NIZUTANI, L.; FARIA, M.; PELLEGRINI BRAGA, J.A. Anemia and protein energy malnutrition among preschool children in São Paulo - Brazil. In: International Congress of Pediatrics, *Annals*, Cairo, 1995. p. 52.
- GIBNEY, M.J. Dietary methods for estimating food additive intake. *Regul Toxicol Pharmacol*, v.30, p.S31-S33, 1999.
- GIBNEY, M.J.; LAMBE, J. Estimation of food additive intake: methodology overview. *Food Addit Contam*, v.13, n.4, p.405-10, 1996.
- GREENACRE, M.J. *Correspondence Analysis in practice*. London: Academy Press, 1993. 370 p.
- HEIMBACH, J.; RIETH, S.; MOHAMEDSHAH, F.; SLESINSKI, R.; SAMUEL-FERNADO, P.; SHEEHAN, T.; DICKMANN, R.; BORZELLECA, J. Safety assessment of iron EDTA [sodium iron (Fe³⁺) ethylenediaminetetraacetic acid]: summary of toxicological, fortification and exposure data. *Food Chem Toxicol*, v.38, p.99-111, 2000.
- HURREL, R.F. Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutr Rev*, v.55, n.6, p.210-22, 1997.
- LÖWIK, M.R.H. Possible use of food consumption surveys to estimate exposure to additives. *Food Addit Contam*, v.13, n.4, p.427-41, 1996.
- MONTEIRO, C.A.; SZARFAC, S.C. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo, SP (Brasil), 1984-1985: V-Anemia. *Rev Saúde Pública*, v.21, p.255-60, 1987.
- MONTEIRO, C.A.; SZARFARC, S.C.; MONDINI, L. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo. *Rev Saúde Pública*, v.34, Supl., p.S62-S72, dez. 2000.

- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Evaluation of certain food additives contaminants*. Geneva: WHO, 1995a (Technical Report Series, 859).
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry*. Geneva: WHO, 1995b (Technical Report Series, 854). 452 p.
- PHILIPPI, S.T.; SZARFARC, S.C.; LATTERZA, A.R. Virtual Nutri (software) versão 1.0, for Windows. Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública/ USP. São Paulo, 1996.
- RENWICK, A.G. Needs and methods for priority setting for estimating the intake of food additives. *Food Addit Contam*, v.13, n.4, 467-75, 1996.
- SIGULEM, D.M.; TUDISCO, E.S.; GOLDENBERG, P.; ATHAIDE, M.M.M.; VAISMAN, E. Anemia ferropriva em crianças do município de São Paulo. *Rev Saúde Pública*, v.12, p.168-78, 1978.
- TORRES, M.A.A.; SATO, K.; SOUSA QUEIROZ, S. Anemia em crianças menores de 2 anos atendidas nas Unidades Básicas de Saúde no Estado de São Paulo. *Rev Saúde Pública*, v.28, p.290-4, 1994.
- WHITTAKER, P.; VANDERVEEN, J.E.; DINOVI, M.J.; KUZNESOF, P.M.; DUNKEL, V.C. Toxicological profile, current use, and regulatory issues on EDTA compounds for assessing use of sodium iron EDTA for good fortification. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 18, p.419-27, 1993.

Recebido para publicação em 20/08/02. Aprovado em 06/12/02.

Importância do ferro em nutrição humana

Importance of iron in human nutrition

ABSTRACT

GERMANO, R.M.A.; CANNIATTI - BRAZACA, S.G. Importance of iron in human nutrition, *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP, v.24, p.85-104, dez., 2002

Iron has been widely studied on account of its importance in human nutrition. This study focus on its biological functions in the human organism, its deficiency, recommended amount, promoters and inhibitors of iron absorption and its bioavailability. Iron deficiency is a nutritional disorder that contributes significantly to lower work capacity as well as to higher morbidity and mortality. Brazil has a high incidence of anemia due to iron deficiency: 50% in children (under 2 years of age) and 35% in pregnant women. The society, the consumer, the scientific community, health agencies and the media have developed a new awareness about the relationship between health and food habits. In this regard, nutritional education is very important to help in food choice and their combinations, on the nutritional point of view, improving iron absorption and reducing its deficiency.

Keywords: iron, absorption, deficiency, human nutrition

ROMILDA MARIA DE ARRUDA GERMANO¹
SOLANGE GUIDOLIN CANNIATTI-BRAZACA¹

¹ Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" -ESALQ/USP

Endereço para correspondência:
Av. Pádua Dias, 11 CP 9
Piracicaba -São Paulo
CEP: 13418-900
e-mail:
sgcbraza@esalq.usp.br

RESUMEN

El hierro ha sido muy estudiado debido a su importancia en la nutrición humana. Este trabajo examina las funciones biológicas en el organismo, las necesidades nutricionales, las sustancias inhibidoras y favorecedoras de la absorción y la biodisponibilidad del hierro. La deficiencia de hierro es un problema nutricional que provoca, además de reducción de la capacidad de trabajo, aumento de la morbilidad y de la mortalidad. En Brasil la prevalencia de anemia por deficiencia de hierro es alta: 50% para los niños (menores de 2 años) y 35% para las mujeres embarazadas. La sociedad, los consumidores, la comunidad científica, los órganos de salud y la prensa tienen ahora mayor discernimiento sobre la relación entre hábitos alimentares y salud. Entonces, la educación nutricional es muy importante para auxiliar en la selección de los alimentos y sus combinaciones desde el punto de vista de la nutrición, a fin de mejorar la absorción de hierro y disminuir su deficiencia.

Palabras clave: hierro, absorción, deficiencia, nutrición humana

RESUMO

O ferro tem sido muito estudado devido à sua importância na nutrição humana. Este estudo enfoca as funções biológicas no organismo humano, a deficiência, as recomendações nutricionais, os promotores e inibidores da absorção e a biodisponibilidade. A deficiência de ferro é uma desordem nutricional que contribui significativamente para a redução da capacidade de trabalho, bem como para o aumento da morbilidade e mortalidade. O Brasil tem uma alta incidência de anemia por deficiência de ferro: 50 % em crianças (menores de 2 anos de idade) e 35 % em gestantes. A sociedade, o consumidor, a comunidade científica, os órgãos da saúde e a mídia possuem uma nova conscientização sobre a relação saúde e hábitos alimentares. Neste ponto, a educação nutricional é muito importante para auxiliar na escolha dos alimentos e de suas combinações, do ponto de vista da nutrição, melhorando a absorção de ferro e reduzindo sua deficiência.

Palavras-chave: ferro, absorção, deficiência, nutrição humana

INTRODUÇÃO

Boussingault, em 1860, foi o primeiro a admitir o ferro como nutriente essencial para animais e até hoje o interesse pelo ferro e pela anemia ferropriva continua imbatível. O ferro é o mineral mais estudado e descrito na história. É encontrado em todas as células dos seres vivos, tanto vegetais como animais e está distribuído por todos os alimentos. As principais fontes são as carnes e vísceras, mas está presente também em muitos alimentos de origem vegetal como leguminosas e nozes, grãos, cereais, vagens e folhas (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

As funções do ferro resultam de suas propriedades físicas e químicas, principalmente de sua capacidade de participar das reações de oxidação e redução, como é o caso das enzimas envolvidas no processo de respiração celular (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

A deficiência de ferro resulta em aumento nas taxas de mortalidade e morbidade, diminui a produtividade no trabalho e prejudica o desenvolvimento mental, que reduz a capacidade da pessoa para viver uma vida saudável e produtiva (WELCH *et al.*, 2000).

No Brasil, a anemia por deficiência de ferro (anemia ferropriva) é o problema nutricional de maior magnitude no país, sobretudo em crianças menores de 2 anos e gestantes, atingindo cerca de 50% e 35% desses dois grupos populacionais, respectivamente (BRASIL, 2002).

O objetivo deste trabalho é o de abordar a importância do ferro na alimentação humana, enfatizando alguns aspectos como as principais funções, a deficiência, os mecanismos de absorção e a biodisponibilidade.

FUNÇÕES BIOLÓGICAS

O ferro desempenha muitas funções no organismo humano. As principais funções do ferro na hemoglobina são: atuar como vetor de oxigênio, formando com o oxigênio uma combinação facilmente dissociável, permitindo que o oxigênio transportado seja cedido aos tecidos na medida das suas necessidades; servir de catalisador da oxidação, nas células e nas moléculas livres de hemina e atuar como constituinte das diástases oxidantes (catalase, peroxidase, citocromos), intervindo em numerosas reações de oxidação, por meio das quais se libera energia dos constituintes alimentares (GUYTON e HALL, 1997). A atividade de muitas enzimas envolvidas nestas reações bioquímicas é diminuída se houver a deficiência de ferro nos tecidos (BEARD *et al.*, 1996).

Existem evidências consideráveis de que o ferro pode desempenhar um papel na conversão de β -caroteno em vitamina A, na síntese de purinas e na detoxificação de drogas no fígado. A resposta à questão de se o estado do ferro tem efeito sobre a imunocompetência e assim sobre a susceptibilidade à infecção ainda não é clara. Apesar do ferro ser essencial ao crescimento de microorganismos, ele também é parte integrante de enzimas e imunoproteínas necessárias para a destruição de organismos infecciosos (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

Em humanos, o ferro é encontrado em inúmeras proteínas como as flavoproteínas, hemeproteínas, participando como componente essencial destas ou como co-fator, principalmente em enzimas como os citocromos, que atuam na cadeia respiratória, fazendo a transferência de elétrons (BEARD *et al.*, 1996). As hemeproteínas mais importantes são: hemoglobina, mioglobina, citocromos, peroxidases e catalases. A maior parte do ferro, cerca de 65% , é integrante da hemoglobina, transportadora de oxigênio nos glóbulos vermelhos. Do restante, 4% estão na mioglobina, 1% sob a forma de diversos compostos hêmicos que promovem a oxidação celular, 0,1% combinado à proteína transferrina no plasma sanguíneo e, 15% a 30% armazenados, principalmente, no fígado, medula óssea, e baço, sob a forma de ferritina ou hemossiderina (GUYTON e HALL, 1997; OLIVEIRA, 1989).

O organismo humano adulto contém cerca de 3 a 5 g de ferro, ou ainda, de 30 a 40 mg/kg de peso corporal, variando de acordo com a idade, o tipo de tecido específico e órgãos examinados. Outro tipo importante de proteína que contém ferro é a lactoferrina, uma glicoproteína que está presente em altas concentrações no leite materno e é a principal fonte de ferro para lactentes, auxiliando na prevenção da anemia no período de amamentação (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995).

RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS

Recomendações nutricionais são as quantidades de energia e nutrientes que devem conter os alimentos consumidos, para satisfazer as necessidades de quase todos os indivíduos de uma população sadia. Baseiam-se nas cifras das necessidades, corrigidas pela biodisponibilidade, às quais se adiciona a quantidade necessária para cobrir a variabilidade individual e, no caso de alguns nutrientes, acrescenta-se também uma quantidade adicional como margem de segurança (VANNUCCHI *et al.*, 1990).

As necessidades de ferro podem ser determinadas em termos da quantidade que se deve absorver para repor as perdas do organismo, e que seja suficiente para cobrir o aumento normal da necessidade, durante o crescimento e a gestação (FAO, 1991).

A necessidade durante a infância é a maior, em relação à ingestão alimentar. A fase de crescimento rápido durante a adolescência, representa outro período de necessidades aumentadas, maiores no homem que na mulher; entretanto, com o início das menstruações, as necessidades da mulher excedem às do homem. Devido à variação individual da capacidade de absorção, as diferenças entre os alimentos quanto à disponibilidade de ferro para absorção, e a capacidade do organismo em aumentar a absorção de ferro durante os períodos de deficiência, é difícil converter as necessidades fisiológicas de ferro em necessidades dietéticas. As recomendações nos Estados Unidos para ferro, estabelecidas pelo “Food and Nutrition Board” do “National Research Council” e os estabelecidos pela junta “FAO/WHO Expert Group”, diferem, apesar de estarem baseadas nas mesmas considerações (FAO, 1991; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

As recomendações diárias de ferro para a população brasileira adaptadas das recomendações para a população dos Estados Unidos, por VANNUCCHI *et al.* (1990), são mostradas na Tabela 1.

Cerca de 80 a 90% do ferro presente nas dietas ocidentais estão na forma de ferro não heme, procedentes, em sua maior parte, dos alimentos de origem vegetal e dos compostos utilizados no enriquecimento de alimentos. Os alimentos de origem vegetal contribuem com 90% do total de ferro ingerido nos países desenvolvidos e até 100% nos países em desenvolvimento (BIANCHI *et al.*, 1992).

Tabela 1 Recomendação de ferro (mg/dia), em diferentes níveis de absorção (%) de ferro não heme da dieta, adaptada à população brasileira

Grupo	Idade (anos)	Alta (8%)¹	Média (5%)²	Baixa (3%)³
Criança*	0,5 a 1,0	4	6	12
	1,1 a 3	6	8	17
	3,1 a 5	7	10	21
	5,1 a 7	8	12	24
	7,1 a 10	9	13	26
	10,1 a 12	9	14	28
Sexo masculino	12,1 a 14	11	16	32
	14,1 a 18	12	18	37
	18,1 a 65	14	20	41
	>65	10	15	30
Sexo feminino	12,1 a 14	9	13	27
	14,1 a 18	10	14	29
	18,1 a 65	9	14	28
	>65	8	12	25
Quantidade adicional na Gravidez	-	1	2	4
Quantidade adicional na Lactação	-	2	3	7

*de zero a seis meses de idade, o aleitamento materno exclusivo supre todas as necessidades do grupo

¹ ingestão > 75 g de carne ou 75 mg de vitamina C; ² ingestão de 25 a 75 g de carne ou 25 a 75 mg de vitamina C; ³ ingestão < 25g de carne ou 25 mg de vitamina C.

Fonte: adaptado de VANNUCCHI *et al.* (1990).

DEFICIÊNCIA

A deficiência nutricional de ferro ocorre quando a quantidade absorvida da dieta é insuficiente para alcançar as necessidades normais. Elas abrangem as perdas obrigatórias do organismo e os requerimentos nutricionais para o crescimento. Se essa deficiência persiste, os estoques orgânicos de ferro são exauridos e a anemia ferropriva se instala, afetando os níveis de hemoglobina sanguínea. A deficiência pode ser causada por ingestão inadequada, absorção deficiente, metabolização imperfeita, perda sanguínea crônica ou aumento das necessidades como na infância, adolescência e gravidez (BRASIL, 2002; CARPENTER e MAHONEY, 1992).

Quando o estoque de ferro do organismo é depletado, o corpo sofre conseqüências funcionais, tais como a ineficiência do transporte de oxigênio e prejuízos no metabolismo oxidativo, no metabolismo nuclear e na transcrição gênica. As seqüelas clínicas incluem a anemia em si, a redução da atividade física, do rendimento do aprendizado e da diminuição da performance no trabalho e a diminuição de eficiência da função imune (BEARD *et al.*, 1996; BRASIL, 2002; CARPENTER e MAHONEY, 1992). A imunocompetência reduzida é um possível sinal de deficiência precoce de ferro, notada particularmente por defeitos na imunidade mediada por células e na atividade fagocítica dos neutrófilos, que podem levar a uma propensão aumentada para infecção (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

Geralmente a deficiência de ferro é caracterizada por 3 estágios, a saber:

(a) depleção de ferro: o armazenamento de ferro é baixo (baixos níveis de ferritina e hemossiderina), pequeno aumento da transferrina livre e valores normais de hemoglobina;

(b) eritropoese deficiente: o nível de saturação da transferrina cai e torna-se insuficiente para a manutenção de uma taxa ótima de eritropoiese; a concentração de protoporfirina dos eritrócitos torna-se elevada, indicando um desequilíbrio entre a produção de protoporfirina e o suprimento intracelular de ferro. Contudo, o suprimento de ferro ainda é suficiente para manter 95% do nível normal de hemoglobina;

(c) anemia ferropriva: o terceiro estágio é caracterizado pelo esgotamento total das reservas de ferro, levando a uma produção insuficiente de hemoglobina, com o desenvolvimento de anemia microcítica e hipocrômica (CARPENTER e MAHONEY, 1992).

A maioria dos sintomas, comuns em anemias, são: cansaço, fadiga, palidez, diminuição da capacidade de trabalho físico, alteração da termorregulação e menor capacidade de concentração. O tempo de restabelecimento das funções cardiorespiratórias normais em indivíduos anêmicos, após esforço, é prolongado. Sintomas gastrointestinais como falta de apetite, flatulência, incômodo epigástrico, náuseas, vômitos, constipação ou diarreia são comuns. Quando a anemia por deficiência de ferro se torna mais severa, os defeitos se desenvolvem na estrutura e função dos tecidos epiteliais, especialmente da língua, unhas, boca e estômago. As mudanças bucais incluem atrofia das papilas linguais, queimadura, vermelhidão e, em casos severos, glossite. A gastrite

ocorre frequentemente e pode resultar em acloridria. A anemia não tratada pode resultar em alterações cardiovasculares e respiratórias que podem eventualmente provocar uma insuficiência cardíaca (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

Alguns sintomas comportamentais de deficiência de ferro parecem responder à terapia antes que a anemia seja curada, sugerindo que elas podem ser o resultado da depleção tecidual de enzimas que contém ferro, em vez de um nível diminuído de hemoglobina (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

ABSORÇÃO E METABOLISMO

Os mecanismos pelos quais o ferro é absorvido, tanto os mecanismos bioquímicos específicos, quanto os de transporte e sua regulação, não estão completamente esclarecidos. Porém, a maioria dos autores relata que a maior quantidade da absorção do ferro ocorre no duodeno e na parte superior do jejuno (BEARD *et al.*, 1996; BIANCHI *et al.*, 1992; BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995; GARCÍA-CASAL *et al.*, 1998; LYNCH, 1997; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

A forma em que o ferro se encontra influencia o seu mecanismo de absorção. O ferro dietético é classificado em 2 formas: ferro heme e ferro não heme. O ferro heme encontra-se na estrutura do anel protoporfirina das hemoproteínas. Ele é encontrado nos alimentos de origem animal sob a forma de hemoglobina e mioglobina, representando cerca de 40% do ferro do tecido animal. Esta forma tem elevada absorção e não é influenciada pelos fatores que interferem na absorção do não heme, como a ionização e a capacidade de se ligar a outras substâncias (CARPENTER e MAHONEY, 1992).

O ferro heme é solúvel no meio alcalino da luz intestinal, sendo facilmente absorvido, como um complexo de ferro-porfirina intacto, diretamente para as paredes da mucosa, por vias diferentes do não heme. É interessante o fato de que, embora existam transportadores específicos para o ferro heme nas mucosas dos ratos, estes não absorvem tão eficientemente o ferro heme quanto os humanos (BEARD *et al.*, 1996; BIANCHI *et al.*, 1992; CARPENTER e MAHONEY, 1992).

Durante a fase intestinal da digestão, quando ocorre a captação, o ferro se liga a locais específicos da membrana da mucosa, é interiorizado e pode tanto ser retido pelas células da mucosa (enterócitos), quanto transportado à membrana basolateral, de onde é ligado à transferrina no “pool” plasmático (BEARD *et al.*, 1996).

Existem dois mecanismos de absorção do ferro que ocorrem simultaneamente. O primeiro é um processo de difusão passiva, na qual a quantidade de ferro absorvida é proporcional à concentração de ferro no lúmen intestinal. Essa via absorviva é predominante somente em indivíduos com reservas normais de ferro. O segundo processo de absorção é limitado, mediado por um transportador dependente de energia, passível de saturação cinética e inibição competitiva. Esse processo predomina quando os estoques de ferro orgânico estão depletados (CARPENTER e MAHONEY, 1992).

Durante a fase intestinal da digestão, o ferro está presente no lúmen, tanto como ferro heme, como quelatos de ferro não heme. O grupamento heme ou é levado diretamente, por difusão ou pelo receptor de membrana para o interior do enterócito. Dentro da célula, o ferro é separado do heme pela enzima hemoxygenase, entrando para o “pool” celular comum, processando-se de maneira análoga ao ferro não heme. O receptor intestinal para o grupamento heme tem sido parcialmente caracterizado na membrana da borda em escova, indicando que a molécula do heme é absorvida intacta (BEARD *et al.*, 1996; BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

Antes da captação pelas células intestinais da borda em escova, o ferro deve atravessar a camada mucosa. A passagem do ferro por esta camada pode ser facilitada por ácidos orgânicos ou por polipeptídeos, como aqueles derivados da digestão de carnes. O ferro não heme, ao chegar ao intestino, sofre a ação do meio alcalino e poderia ser completamente oxidado à forma férrica, se não houvessem fatores luminais que o mantivessem solúvel. Moléculas ligantes de ferro, além dos fatores dietéticos, atuam para manter o ferro solúvel, sendo que muitas podem ser proteínas produzidas pelo estômago e fígado, porém não são completamente conhecidas (BEARD *et al.*, 1996; BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995; GUYTON e HALL, 1997).

Outra via de captação é a lactoferrina. Existem nas células da mucosa intestinal receptores específicos para a lactoferrina, os quais têm sido isolados nas membranas da borda em escova, porém, seu papel na absorção do ferro necessita de diversos esclarecimentos (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995).

Há, ainda, outras propostas para a absorção do ferro não heme, por meio da ligação com proteínas carreadoras. Uma delas é a de que outra proteína, a mucina, se ligaria ao ferro férrico, solubilizando-o e tornando-o mais biodisponível para o organismo (BENITO e MILLER, 1998).

Apesar do mecanismo de passagem do ferro pelo enterócito não ser ainda muito claro, o processo de liberação na célula da mucosa intestinal também parece ser realizado com a participação de uma proteína ligante, pois o ferro não pode existir de forma iônica dentro da célula, então, depois de liberado pela proteína carreadora é imediatamente ligado a uma proteína já presente na célula (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995).

Muito do ferro captado nas células da mucosa é transferido para o sangue quase que imediatamente, mas, depois desta rápida fase de absorção, a transferência continua em uma razão muito mais baixa durante 24 horas, devido à estocagem temporária de ferro na célula, como ferritina. Nem todo o ferro que entra na mucosa do trato gastrintestinal é transferido para o plasma. Isto pode ser devido às perdas por espoliação das células do epitélio intestinal com conseqüente descarga de ferro na forma de ferritina (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995).

A absorção de ferro correlaciona-se de forma inversamente proporcional com o *status* de ferro no indivíduo. Em condições normais, a taxa de absorção em humanos adultos é de 5% a 15% do ferro dos alimentos. Já em condições de deficiência de ferro,

esta taxa pode chegar a 50 %. Os mecanismos para esta indução são em grande parte desconhecidos. Com relação ao ferro heme, um fator que possivelmente contribua para o aumento de sua absorção, é a hemoxygenase intestinal que é ativada pela deficiência somática de ferro. Em um experimento com humanos, esta enzima não foi influenciada pela administração oral de hemoglobina, mas foi influenciada pela deficiência de ferro. Sua distribuição no intestino era idêntica às áreas de absorção máxima de ferro heme (BEARD *et al.*, 1996; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

A hemoglobina e a ferritina sérica têm papéis aparentemente limitados no estabelecimento da necessidade de se absorver ferro. Tem sido sugerido que a presença no plasma do complexo transferrina-ferro permitiria ao enterócito monitorar a quantidade de ferro corporal e regular sua absorção. A exposição da célula da mucosa intestinal a baixa quantidade de transferrina-ferro sinalizaria à mesma sobre a necessidade de liberação de ferro para o corpo (BEARD *et al.*, 1996).

Quando o organismo se torna saturado de ferro de modo que toda a apoferritina das áreas de estoque de ferro já esteja combinada com o mesmo, a velocidade de absorção deste mineral, pelas células da borda em escova, diminui consideravelmente. Pois quando toda a apoferritina do corpo se liga com o ferro, torna-se difícil para a transferrina liberar ferro para os tecidos. Como consequência, a transferrina, que normalmente está apenas 1/3 saturada com ferro, torna-se completamente saturada e não aceita ferro suplementar das células mucosas. Por outro lado, quando o organismo tem depósitos excessivos de ferro, o fígado diminui a velocidade de formação de apotransferrina e, portanto reduz a concentração desta molécula no plasma e na bile (GUYTON e HALL, 1997).

Outro mecanismo de controle da absorção de ferro decorre de estados de hipóxia e pela produção de eritrócitos. Qualquer condição que cause a diminuição da quantidade de oxigênio transportada para os tecidos, normalmente, aumenta a velocidade de produção das hemácias. Assim, quando uma pessoa se torna extremamente anêmica em virtude de uma hemorragia ou outra condição, a medula óssea começa, imediatamente, a produzir grandes quantidades de hemácias. O principal fator que estimula a produção de hemácias é um hormônio circulante chamado eritropoetina. Na ausência de eritropoetina, a hipóxia tem pouco ou nenhum efeito sobre a estimulação da produção de hemácias. No outro extremo, quando grandes quantidades de eritropoetina são produzidas e se há ferro abundante e disponível e outros nutrientes necessários, a velocidade de produção de hemácias aumenta dez vezes ou mais em relação ao normal (GUYTON e HALL, 1997).

Ambas as situações aumentam a mobilização de ferro para a produção de hemácias, tanto dos estoques corporais, quanto da transferrina circulante no plasma. Esta, por sua vez, acaba por liberar o ferro preso à molécula, deixando mais apoferritina livre, sinalizando aos enterócitos sobre a necessidade de aumento da absorção (GUYTON e HALL, 1997).

Após a absorção, este ferro captado nas vilosidades intestinais chega enfim à membrana basolateral do enterócito e é finalmente liberado para o plasma sanguíneo. Aí combina-se com a apotransferrina para formar a transferrina, que é então transportada

no plasma até os tecidos corporais, onde liberará o ferro que poderá ser estocado ou utilizado pelas células. A transferrina não somente é responsável pela liberação do ferro da superfície basolateral dos enterócitos para os tecidos, mas também pela redistribuição do ferro aos vários compartimentos do corpo e pela proteção ao ferro durante a filtração glomerular (BEARD *et al.*, 1996).

Quando o ferro está presente em grandes quantidades no sangue, ele é armazenado. Cerca de 200 a 1.500 mg de ferro podem ser armazenados no organismo, como ferritina e hemossiderina, duas proteínas especializadas na estocagem deste mineral. A hemossiderina é semelhante a ferritina, mas contém mais ferro e é muito insolúvel. Certos indivíduos, portadores de alterações genéticas, absorvem quantidades maiores de ferro do que as habituais e desenvolvem hemossiderose, uma doença de armazenamento de ferro. Se a hemossiderose estiver associada à lesão tecidual, ela é chamada hemocromatose (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998). Embora a regulação dos estoques possa ser mantida, mesmo em situações de ingestão aumentada, parece que os mecanismos de controle não são efetivos em todos os indivíduos (LYNCH e BAYNES, 1996).

Quantidades mínimas de ferritina circulante, detectáveis pelo uso de técnicas de imunoensaio sensitivas, estão correlacionadas proximamente com os estoques de ferro do organismo. Cerca de 30% deste ferro se apresenta como reserva no fígado, outros 30% na medula óssea e o restante no baço e músculos. A medida da ferritina sérica é uma ferramenta inestimável para a avaliação do estado clínico do ferro (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

A maneira como o organismo conserva e reutiliza o ferro é uma importante característica do metabolismo desse mineral. Mais de 90% do ferro da hemoglobina são repetidamente reciclados. A hemoglobina possui vida média de 120 dias; passado este período, o mecanismo de reciclagem é feito através da fagocitose dos eritrócitos velhos, processo que ocorre, principalmente, nos macrófagos do fígado e baço. A destruição normal da hemoglobina das hemácias libera, por dia, 90 mg de ferro, que são reaproveitadas pelo organismo quase que totalmente (FERREIRA, 1993).

Normalmente, somente pequenas quantidades de ferro são excretadas pelo organismo. A maior parte do ferro perdido nas fezes consiste de ferro não absorvido da dieta. O restante representa o ferro contido nas células descamadas do epitélio gastrointestinal, excreção de bile, descamação normal das células da pele e sangramentos. Praticamente nenhuma quantidade de ferro é excretada na urina e no suor. O homem perde ao redor de 1 mg de ferro diariamente. Na mulher existe uma perda adicional de ferro que acompanha a menstruação, ao redor de 0,5 mg por dia (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998; OLIVEIRA, 1989).

O ferro para o metabolismo provém de três fontes: o reutilizado da degradação da hemoglobina, o liberado dos depósitos do corpo e o absorvido do aparelho gastrointestinal. Dessas três fontes, a maior contribuição provém da hemólise (OLIVEIRA, 1989).

FATORES QUE AFETAM A ABSORÇÃO

O processo de absorção de ferro é controlado por fatores intraluminais (da mucosa) e fatores somáticos. Os intraluminais que afetam a quantidade de ferro disponível para absorção, inibindo-a ou promovendo-a, são inúmeros, como, o pH intestinal, componentes da dieta (fatores antinutricionais, presença de outros minerais, ingestão de antiácidos), entre outros. Os fatores da mucosa incluem a quantidade de superfície de mucosa e a motilidade intestinal. Os fatores somáticos que influenciam a absorção incluem a eritropoiese e a hipóxia (BEARD *et al.*, 1996; BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995). A quantidade e forma química do ferro presente no lúmen intestinal, a secreção estomacal e a bile (que aumenta a absorção do ferro pela ação de substâncias redutoras) são outros fatores interferentes (BIANCHI *et al.*, 1992).

Há ampla variação na quantidade de ferro que pode ser absorvida. A absorção do ferro heme é alta: cerca de 15 a 30% no indivíduo normal e 35 a 50% naqueles com baixa reserva de ferro. Dado que a absorção de ferro heme é relativamente independente da combinação com os alimentos e está só ligeiramente influenciada pelo estado nutricional do indivíduo, sua contribuição na dieta pode ser estimada medindo-se quimicamente seu conteúdo na dieta, supondo uma absorção de 25% (BIANCHI *et al.*, 1992; ELPO *et al.*, 1998; FAO, 1991). Já a absorção do ferro não heme é muito menor que a do ferro heme: cerca de 0 a 10 %, dependendo muito de fatores químicos, como o estado de oxidação, a solubilidade, o pH do meio e, ainda, dos componentes dietéticos. O ferro heme pode ser absorvido tanto ligado com a proteína transferrina na mucosa ou pode atravessar a membrana por difusão (BIANCHI *et al.*, 1992; ELPO *et al.*, 1998).

A absorção de ferro é afetada por fatores fisiológicos e por fatores que afetam a disponibilidade de ferro em sua fonte. As formas inorgânicas de ferro (FeSO_4) são prontamente absorvidas pela mucosa do intestino delgado. Os sais ferrosos (Fe^{2+}) são mais prontamente absorvidos que os sais férricos (Fe^{3+}). A maior absorção ocorre no duodeno superior devido ao ambiente ácido. A taxa de absorção de ferro é controlada pela quantidade captada pela mucosa intestinal em resposta às necessidades corporais de ferro, que são refletidas pela quantidade disponível no sangue para suprir as necessidades das células recém-formadas (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

Na presença de substâncias dietéticas inibidoras, a capacidade de absorção pode não ser suficiente para fornecer todo o ferro necessário ao organismo (CARPENTER e MAHONEY, 1992).

PROMOTORES DA ABSORÇÃO

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

As secreções gástricas contribuem, ainda, com a produção de uma substância chamada fator intrínseco, que aumenta a absorção do ferro ao se ligar ao mesmo (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

O ácido ascórbico e a carne ou tecido animal são os dois maiores promotores dietéticos, conhecidos, da biodisponibilidade de ferro. O ácido ascórbico, como agente redutor, mantém o ferro dos alimentos no estado ferroso, que é mais solúvel. Também, forma quelato ferro-ascorbato, que se mantém solúvel mesmo com o aumento do pH no intestino delgado proximal (GARCÍA-CASAL e LAYRISSE, 1998). O ferro da alimentação à base de frutas e vegetais (ricos em ácido ascórbico), normalmente, é altamente disponível. A absorção do ferro aumenta de 3,7 para 10,4% em refeições com pão, ovo e chá depois da adição de 40 a 50 mg de ácido ascórbico (BIANCHI *et al.*, 1992).

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

GERMANO (2002) observou, em seu estudo, que o teor de proteínas e o conteúdo de extrato etéreo em misturas com ovo, aumentaram a diálise *in vitro* do ferro não heme, e concluiu que estes dois componentes atuaram de forma significativa no aumento da absorção do ferro quando comparado ao β -caroteno.

Outros fatores, como alguns açúcares (frutose) e os aminoácidos sulfurados, formam complexos com o ferro não heme, tornando-o solúvel no pH do lúmen intestinal, favorecendo sua absorção (GARCÍA-CASAL e LAYRISSE, 1998; MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998). Também, os ácidos orgânicos, tais como, cítrico, málico, láctico, succínico e tartárico, promovem a absorção do ferro (LATUNDE-DADA e NEALE, 1986).

INIBIDORES DA ABSORÇÃO

Alguns componentes dos alimentos podem inibir a absorção do ferro não heme, por formarem precipitados, quelatos insolúveis ou macromoléculas de baixa biodisponibilidade (BIANCHI *et al.*, 1992). Outros chegam a competir com os sítios de ligação das células da mucosa intestinal para a absorção, ou mesmo com as proteínas ligantes presentes na luz intestinal que tornariam o ferro mais solúvel (CLYDESDALE, 1983).

Entre os fatores intraluminais extrínsecos citados na literatura como inibidores da absorção do ferro, estão, alguns dos componentes das fibras, o ácido oxálico, o ácido fítico e outros polifenóis. Porém, os relatos sobre o efeito exato e o mecanismo de ação destes fatores são ainda muito controversos.

O ácido oxálico, um ácido dicarboxílico, e seus sais são considerados como antinutricionais; eles podem tornar certos nutrientes minerais indisponíveis por ligarem-se a eles

formando sais insolúveis que não são absorvidos no intestino (VITAKON, 1986), entretanto alguns estudos têm demonstrado um efeito neutro e até positivo na absorção do ferro, tanto em ratos quanto em humanos (GORDON e CHAO, 1984; HALLBERG, 1981).

O ácido fítico é um constituinte de muitos alimentos de origem vegetal, é um excelente quelante de íons minerais. Desde que o fitato não pode ser absorvido e os seres humanos têm limitada capacidade de hidrolisar a molécula de fitato, um efeito prejudicial do ácido fítico na biodisponibilidade de minerais é esperado (LONNERDAL *et al.*, 1980).

Porém, o efeito inibitório do ácido fítico é ainda muito contraditório. Em 1976, MORRIS e ELLIS (1976) demonstraram que o fitato monoférrico complexado ao ferro permanece solúvel e, portanto, biodisponível. Este tipo de fitato corresponde à cerca de 60% no trigo. Quando se associa a mais moléculas de ferro, como o caso do fitato férrico (com 3 ou 4 moles de ferro/molécula), torna-se insolúvel e portanto com baixa biodisponibilidade. Em outro estudo, os mesmos autores descreveram que há razões para acreditar que os fitatos inibam a absorção já que ambos, fitato diférrico e tetraférrico foram pobremente biodisponíveis (MORRIS e ELLIS, 1976) e estas são as formas encontradas em vários vegetais como no gérmen de trigo e nas lentilhas (GILLOOLY *et al.*, 1984).

Os polifenóis, incluindo os taninos e fitatos, dificultam a absorção do ferro. Quimicamente os taninos são classificados em dois grupos principais, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos tenham moléculas de poli-hidroxifenóis ou seus derivados. O primeiro grupo é composto pelos chamados taninos hidrolisáveis (como o ácido tânico), mais usados para a curtição de couros. O segundo grupo contém outros tipos de taninos, encontrados em maior quantidade e de maior importância em alimentos, sendo denominados taninos condensados. A estrutura básica dos taninos condensados é relacionada à estrutura da catequina e dos 3', 4', 5, 7-hidroxiflavonóides (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

Os principais efeitos antinutricionais dos taninos são: a inativação de enzimas digestivas, pela sua ligação seletiva às mesmas, formando complexos insolúveis e a capacidade de complexação com minerais, diminuindo a absorção, principalmente de ferro, pois são quelantes naturais desse mineral (GEIL e ANDERSON, 1994; GOYCOOLEA *et al.*, 1990; PROULX *et al.*, 1993).

O tanino, presente no chá e no café é um inquestionável inibidor da absorção do ferro. O alto conteúdo de tanino, nestas bebidas, formaria um complexo insolúvel com o ferro, inviabilizando sua absorção (GARCÍA-CASAL e LAYRISSE, 1998). Outros experimentos demonstraram que o café reduziu cerca de 33% a absorção do ferro contido na carne de hambúrguer. Já com uma xícara de chá preto, essa redução foi de aproximadamente 64% (MORCK *et al.*, 1983). Os taninos presentes em feijões (*Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus acutifolius*) também são citados como os maiores fatores inibidores da solubilidade do ferro (BENITEZ *et al.*, 1994), entretanto AMAYA *et al.* (1991) constataram que o conteúdo de taninos não tem correlação com a disponibilidade do ferro em feijões.

A questão da fibra como fator interferente ainda é discutível. REINHOLD *et al.* (1981) demonstram que componentes da fibra do trigo e do milho ligam-se ao ferro *in vitro*. Entretanto, a adição de farelo de trigo a pães com a mesma quantidade de fitato não teve nenhum efeito sobre a absorção do ferro em ratos (FAIRWEATHER-TAIT, 1982). Já, GILLOOLY *et al.* (1984), em seu estudo sobre a absorção de cereais, concluíram que embora a lignina e a hemicelulose tenham inibido a absorção do ferro em humanos, a pectina e a celulose, mostraram efeito oposto. GERMANO (2002) observou em seu estudo *in vitro* com misturas de alimentos, que a fibra atuou como fator limitante na absorção de ferro.

Interações com outros íons metálicos, ou minerais, também afetam a absorção de ferro. Geralmente, grandes quantidades de cátions divalentes na dieta inibem a absorção do ferro, assim como a absorção de outros íons é afetada, do mesmo modo, pelo ferro. A competição entre cátions similares na captação das células da mucosa intestinal tem sido descrita entre cobre, zinco, manganês e cobalto, porém, os mecanismos para esta interação não foram ainda esclarecidos (BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1995).

Pesquisadores afirmaram que o magnésio pode inibir a absorção do ferro, quando a proporção de magnésio em uma refeição é de trezentas vezes a de ferro. O zinco reduz a absorção de ferro quando o seu conteúdo na refeição é cinco vezes maior que o ferro, e, quando o consumo de cálcio é superior a 500 mg, ocorre inibição da absorção do ferro (GARCÍA-CASAL e LAYRISSE, 1998; LAYRISSE *et al.*, 1997). Porém a inibição provocada pelo cálcio é ainda controversa. WAUBEN e ATKINSON (1999) não detectaram o comprometimento do *status* de ferro, quando se ofereciam dietas com altas quantidades de cálcio.

Aditivos e quelantes sintéticos como o alginato de sódio em sorvetes, marmelada e maionese, a tetraciclina, o EDTA (ácido etileno diaminotetracético) entre outros, podem diminuir a biodisponibilidade do ferro (LATUNDE-DADA e NEALE, 1986).

BIODISPONIBILIDADE

O termo biodisponibilidade ou disponibilidade biológica tem sido extensivamente usado na área de alimentos e nutrição. Sua origem conceitual, entretanto, provém da farmacologia experimental, especificamente em relação às drogas (BIANCHI *et al.*, 1992). Define-se, portanto, biodisponibilidade como a proporção do nutriente nos alimentos que é efetivamente absorvida e utilizada. Tal conceito engloba o processo de assimilação, transporte e conversão de um nutriente para suas formas biologicamente ativas. Biodisponibilidade, portanto, não é propriedade de dieta ou alimento por si, mas do indivíduo em relação ao alimento ou dieta (COZZOLINO e PEDROSA, 1995).

O termo biodisponibilidade, relacionado ao ferro, é a medida daquela fração do ferro alimentar capaz de ser absorvida pelo trato gastrointestinal e, subsequentemente armazenada e incorporada ao heme (BIANCHI *et al.*, 1992).

Uma característica importante dos minerais, é que compostos, quando metabolizados, liberam os respectivos íons que são reutilizados pelo organismo. Desta maneira,

suas necessidades são sempre iguais às perdas obrigatórias adicionadas às quantidades para formação de tecidos novos ou de crescimento. Nas recomendações de minerais tem que se levar em conta também, a sua biodisponibilidade, absorção intestinal e inter-relações com outros nutrientes que interferem com a absorção (CARRAZZA, 1988).

Com o conhecimento da biodisponibilidade dos minerais, considerando os fatores da dieta e do indivíduo, as recomendações destes nutrientes poderão ser estabelecidas com maior precisão e desta forma poderão ser elaborados guias de alimentação específicos para cada país (COZZOLINO, 1997).

A deficiência, pelo menos para o ferro, quase sempre não é somente causada pela baixa ingestão deste mineral na dieta, mas também por uma série de fatores que afetam a sua biodisponibilidade nos alimentos. Exemplo disso são os muitos alimentos que são aparentemente boas fontes de ferro, mas são limitados pela sua disponibilidade biológica; que se dá em função de sua forma química e da presença de itens alimentares que promovam ou inibam sua absorção (DE ANGELIS, 1999; GERMANO, 2002; LATUNDE-DADA e NEALE, 1986).

A biodisponibilidade do ferro é ainda influenciada por diversos fatores (que também afetam a absorção de minerais, como cálcio, zinco, cobre e magnésio), como as necessidades nutricionais individuais, a adequação das secreções intestinais, a integridade e bom funcionamento de todo o trato gastrointestinal, os estados fisiológicos, como o de crescimento e gravidez, e, doenças nutricionais (DE ANGELIS, 1999; LATUNDE-DADA e NEALE, 1986).

A forma de ferro alimentar também pode afetar sua biodisponibilidade. A absorção do ferro não heme depende do sal ou quelato usado, que podem aumentar ou reduzir a absorção do ferro, dependendo das suas constantes de estabilidade e solubilidade no pH intraluminal (CHAUD e FREITAS, 1994).

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

No meio ácido, os íons ferrosos e féricos não ocorrem em estado livre e são hidratados, respectivamente para $Fe(H_2O)_6^{2+}$ e $Fe(H_2O)_6^{3+}$. Com o aumento do pH, as moléculas de água doam prótons para formar hidróxidos insolúveis de ferro: o $Fe(H_2O)_6^{3+}$ forma $Fe(OH)_3$ e o $Fe(H_2O)_6^{2+}$ forma $Fe(OH)_2$. No pH =1, do estômago, o ferro é solúvel e está na forma hidratada. Quando o pH aumenta, o ferro torna-se um hidróxido insolúvel e, como a solubilidade é pré-requisito para a sua captação pelo intestino, a insolubilidade do ferro é o fator que, neste caso, dificulta sua absorção. Íons féricos no meio alcalino intestinal precipitam-se irreversivelmente e as macromoléculas resultantes de hidróxido férico são muito grandes para serem absorvidas (BIANCHI *et al.*, 1992; GUYTON e HALL, 1997).

Vários fatores (Quadro 1) e interações dietéticas (Quadro 2) podem influenciar a biodisponibilidade do ferro não heme.

A biodisponibilidade do ferro não heme depende ainda do meio químico gerado no intestino pelos alimentos e a proporção dos fatores dietéticos, que podem inibir ou facilitar sua absorção (BIANCHI *et al.*, 1992; GERMANO, 2002).

Quadro 1 Fatores que afetam a biodisponibilidade do ferro

Corpo	<ul style="list-style-type: none">• estado fisiológico• estado nutricional• estado patológico
Secreções	<ul style="list-style-type: none">• suco gástrico• secreções pancreáticas• bile
Fatores Químicos	<ul style="list-style-type: none">• forma química: heme e não heme• estado de oxidação• solubilidade• pH• capacidade de complexação
Fatores Dietéticos	<ul style="list-style-type: none">• constituintes da dieta• facilitadores (ácido ascórbico, tecido animal, frutose)• inibidores (oxalatos, taninos, fibras, outros)

Fonte: BIANCHI *et al.*, 1992.

CONCLUSÕES

Apesar da crescente modernização e dos avanços tecnológicos na área de alimentos e nutrição, ainda hoje a deficiência de ferro é um dos maiores problemas nutricionais, não só em países em desenvolvimento, como também em países mais desenvolvidos, fazendo com que a anemia ferropriva seja uma doença democrática, afetando qualquer pessoa em qualquer nível social.

Além dos danos em crianças, a redução do desenvolvimento físico e mental pode causar grandes perdas à sociedade através da redução dos retornos aos investimentos em capital humano que ocorrerão na fase adulta do indivíduo.

Com a ajuda da sociedade, da comunidade científica, do governo, dos órgãos da saúde, da mídia e do próprio consumidor, atualmente, têm havido maior conscientização sobre íntima relação entre a saúde e os hábitos alimentares.

Portanto, a importância de uma alimentação equilibrada e diversificada é fundamental na manutenção da saúde do indivíduo durante toda a sua vida. Neste ponto, a educação nutricional é muito importante, pois esclarece que é possível suprir as necessidades orgânicas através do consumo de alimentos presentes no dia-a-dia do indivíduo. Estes alimentos devem ser combinados da forma mais conveniente para o melhor aproveitamento do ferro, proporcionando boa absorção através de combinações de alimentos. A utilização de alimentos com fatores promotores da absorção do ferro é fundamental para minimizar os números desta deficiência.

Quadro 2 Interações dietéticas que alteram a biodisponibilidade do ferro

NUTRIENTE QUE INTERAGE EFEITOS	
Proteínas	Aumentam a absorção do ferro não heme
Aminoácidos	Mistura de aminoácidos favorecem a absorção do ferro, sendo a cisteína um dos aminoácidos mais ativos
Ácidos orgânicos	Dietas com alto conteúdo de ácido lático, facilitam a absorção
Fosfatos de cálcio	Diminuem a absorção
Zinco	A administração de suplementos de zinco inibem a absorção do ferro. Se o suplemento contiver os 2 elementos, a biodisponibilidade de ferro é menor quanto maior a proporção Zn:Fe
Vitamina C	Favorece a absorção do ferro não heme ao mantê-lo solúvel no pH intestinal. Facilita a mobilização de ferro ao inibir a degradação de ferritina por enzimas lisossômicas. Sua deficiência causa acumulação de Fe-hemossiderina
Vitamina A	Sua deficiência inibe a utilização do ferro e acelera o aparecimento de anemia. A deficiência de ferro se associa epidemiologicamente com a deficiência de vitamina A
Chá, café	Ao se tomar chá, simultaneamente, com fonte de ferro, a absorção cai de 10,4 para 3,3 %, devido à formação de complexos com taninos na luz intestinal. O café também inibe a absorção de ferro
Polifenóis	Ligam e insolubilizam o ferro

Fonte: CABALLERO, 1988.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCE

- AMAYA, H.; ACEVEDO, E.; BRESSANI, R. Efecto del recalentamiento sobre la disponibilidad de hierro y el valor nutritivo de la proteína del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) cocido. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.41, n.2, p.222-237, Jun. 1991.
- BEARD, J.L.; DAWSON, H.; PIÑERO, D.J. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr. Rev.*, v.54, n.10, p.295-317, 1996.
- BENITEZ, M.A.; GRIJALVA, M.I.; VALENCIA, M.E. Total and soluble iron content and effect of certain inhibitors present in select varieties of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *J. Agr. Chem.*, v.42, p.1300-1302, 1994.
- BENITO, P.; MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutr. Research*, v.18, n.3, p.581-603, 1998.
- BIANCHI, M.L.P.; SILVA, H.C.; OLIVEIRA, J.E.D. Considerações sobre a disponibilidade de ferro dos alimentos. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.42, n.2, p.94-100, 1992.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. *Introdução à química de alimentos*. 2.ed. São Paulo: Varela, 1995. 223p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Área técnica de alimentação e nutrição*. <<http://www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/carencias/index/html>> (03 fev. 2002).
- BRITISH NUTRITION FOUNDATION. *Iron nutritional and physiological significance*. London: Chapman e Hall, 1995. 186p.
- CABALLERO, B. Interacciones entre los componentes de la dieta. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.38, n.3, p.656-684, 1988.
- CARPENTER, C.E.; MAHONEY, A.W. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.31, n.4, p.333-367, 1992.
- CARRAZZA, F.R. Minerais em dietas latinoamericanas. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.38, n.3, p.599-621, 1988.
- CHAUD, M.V.; FREITAS, O. Compostos alternativos para o tratamento e/ou prevenção da anemia ferropriva. *Cad. Nutr.*, v.8, p.1-9, 1994.
- CLYDESDALE, F.M. Physicochemical determinants of iron bioavailability. *Food Tech.*, v.37, n.10, p.133-144, 1983.
- COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de minerais. *Rev. Nutr. PUCCAMP*, v.10, n.2, p.87-98, jul./dez. 1997.
- COZZOLINO, S.M.F.; PEDROSA, L.F.C. Grupo de trabalho: biodisponibilidade de nutrientes. *Boletim SBCTA*, v.29, n.1, p.53-56, jan./jun. 1995.
- DE ANGELIS, R.C. *Fome oculta, impacto para a população do Brasil*. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. 236p.
- ELPO, E.R.S.; FREITAS, R.J.S.; GOMES, E.C. Avaliação dos teores de ferro nos alimentos da cesta básica. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.48, n.1, p.65-67, 1998.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. The effect of different levels of wheat bran on iron absorption in rats from bread containing similar amounts of phytate. *Brit. J. Nutr.*, v.47, p.243-249, 1982.
- FAO (Roma). *Necesidades de vitamina A, hierro, folato y vitamina B₁₂*; Informe de una consulta mista FAO/OMS de expertos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1991. 121p. (Serie Estudios FAO Alimentación y Nutrición)
- FERREIRA, F.A.G. *Nutrição humana*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1993. 1291p.
- GARCÍA-CASAL, M.N.; LAYRISSE, M. Absorción del hierro de los alimentos: papel de la vitamina A. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.48, n.3, p.191-195, 1998.

- GARCÍA-CASAL, M.N.; LAYRISSE, M.; SOLANO, L.; BARÓN, M.A.; ARGUELLO, F.; LLOVERA, D.; RAMÍREZ, J.; LEETS, I.; TROPPER, E. Vitamin A and β -carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *J. Nutr.*, v.128, n.3, p.646-650, Mar. 1998.
- GEIL, P.B.; ANDERSON, J.W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. *J. Amer. Clin. Nutr.*, v.13, n.6, p.549-558, 1994.
- GERMANO, R.M.A. Disponibilidade de ferro na presença do β -caroteno e o efeito dos interferentes em combinações de alimentos. Piracicaba, 2002. 95p. Dissertação. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo.
- GILLOOLY, M.; BOTHWELL, T.H.; CHARLTON, R.W.; TORRANCE, J.D.; BEZWODA, W.R.; MacPHAIL, A.P.; DERMAN, D.P. Factors affecting the absorption of iron from cereals. *Brit. J. Nutr.*, v.51, p.37-46, 1984.
- GORDON, D.T.; CHAO, L.S. Relationship of components in wheat bran and spinach to iron bioavailability in the anemic rat. *J. Nutr.*, v.114, p.526-535, 1984.
- GOYCOOLEA, F.; MEJÍA, E.G.; BARRÓN, J.M.; VALENCIA, M.E. Efecto de los tratamientos caseros en la preparación de frijol Pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el contenido de taninos y valor nutritivo de las proteínas. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.40, n.2, p.263-274, 1990.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de fisiología médica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014p.
- HALLBERG, L. Bioavailability of dietary iron in man. *Ann. Rev. Nutr.*, v.1, p.123-147, 1981.
- LATUNDE-DADA, G.O.; NEALE, R.J. Review: availability of iron from foods. *J. Food Tech.*, v.21, p.255-268, 1986.
- LAYRISSE, M.; GARCÍA-CASAL, M.N.; SOLANO, L.; BARON, M.A.; ARGUELLO, F.; LLOVERA, D.; RAMÍREZ, J.; LEETS, I.; TROPPER, E. The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: preliminary results. *J. Nutr. Biochem.*, v.8, n.2, p.61-67, Feb. 1997.
- LONNERDAL, B.; SANDBERG, A.S.; KUNZ, C. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rate. *J. Nutr.*, v.119, n.2, p.211-214, 1980.
- LYNCH, S.R. Interaction of iron with other nutrients. *Nutr. Rev.*, v.55, n.4, p.102-110, 1997.
- LYNCH, S.R.; BAYNES, R.D. Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for iron dietary recommendations. *J. Nutr.*, v.126, n.9, p.2404S-2409S, 1996. Supplement.
- MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. *Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia*. 9.ed. São Paulo: Roca, 1998. 1179p.
- MORCK, T.A.; LYNCH, S.R.; COOK, J.D. Inhibition of food iron absorption by coffee. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.37, p.416-420, 1983.
- MORRIS, E.R.; ELLIS, R. Isolation of monoferric phytate from wheat bran and its biological value as an iron source to the rat. *J. Nutr.*, v.106, p.753-760, 1976.
- OLIVEIRA, J.D.E.; SANTOS, A.C.; WILSON, E.D. *Nutrição básica*. São Paulo: Editora Sarvier, 1989. 286p.
- PROULX, W.R.; WEAVER, C.M.; BOCK, M.A. Trypsin inhibitor activity and tannin content do not affect calcium bioavailability of three commonly consumed legumes. *J. Food Sci.*, v.58, n.2, p.382-384, 1993.
- REINHOLD, J.G.; GARCIA, L.J.S.; GARZON, P. Binding of fiber of wheat and maize. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.34, p.1384-1391, 1981.

- VANNUCCHI, H.; MENEZES, E.W.; CAMPANA, A.O.; LAJOLO, F.M. Aplicação das recomendações nutricionais adaptadas à população brasileira. *Cad. Nutr.*, São Paulo, v.2, p.1-155, 1990.
- VITAKON, P. Oxalate in vegetable amaranth (*Amaranthus gangeticus*) forms, contents and their possible implications for human health. *J. Sci. Agric.*, v.48, p.469-474, 1986.
- WAUBEN, I.P.M.; ATKINSON, S.A. Calcium does not inhibit iron absorption or alter iron status in infant piglets adapted to a high calcium diet. *J. Nutr.*, v.129, p.709-711, 1999.
- WELCH, R.M.; HOUSE, W.A.; BEEBE, S.; CHENG, Z. Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, n.48, p.3576-3580, Aug. 2000.

Recebido para publicação em 28/06/02. Aprovado em 06/12/02.

Ácidos graxos: uma revisão

Fatty acids: a review

ABSTRACT

MOREIRA, N.X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Fatty acids: a review. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = *J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP, v.24, p.105-123, dez., 2002

Dietary lipids are a source of essential fatty acids to the human organism, where linoleic and α -linolenic acids are good examples. Fatty acids are important to energy balance, membrane biosynthesis, eicosanoids production and others specialized functions. In the tissues, fatty acids can be oxidized to acetyl CoA (β -oxidation) or esterified to acylglycerol, which, similar to triacylglycerols, are the caloric source to the organism. Most of the functional properties of membranes are influenced by fatty acids present in the phospholipids. Saturated fatty acids decrease the membranes' fluidity, whereas poliunsaturated fatty acids increase it. The aim of this work was to report the usual aspects involved with different dietary fatty acids.

Keywords: *cis* and *trans* fatty acids, eicosanoids, lipids

**NARA XAVIER
MOREIRA¹, RUI CURI²,
JORGE MANCINI-
FILHO¹**

¹Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo,

²Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência:

Jorge Mancini-Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo.

Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 14.
05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

Fax: (11) 3815.44.10
e-mail: jmancini@usp.br

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP, PRONEX e CNPq pelo apoio financeiro e à CAPES pela bolsa de estudo concedida.

RESUMEN

Los lípidos de la dieta son fuente de ácidos grasos esenciales para el organismo humano, donde se encuentran los ácidos linoleico y α -linolénico. Los ácidos grasos son importantes para el balance de energía, la biosíntesis de membranas, la producción de eicosanoides y otras funciones específicas. En los tejidos, los ácidos grasos pueden ser oxidados a acetil-CoA (b-oxidación) o esterificados a acilglicerol que es la forma más eficiente de reserva calórica del organismo. Muchas de las propiedades funcionales de las membranas están influenciadas por los ácidos grasos que componen los fosfolípidos. Los ácidos grasos saturados disminuyen la fluidez de las membranas, mientras los ácidos grasos poliinsaturados la aumentan. El presente trabajo tiene por objetivo relatar los aspectos generales relacionados con los ácidos grasos de la dieta.

Palabras clave: ácidos grasos *cis* y *trans*, eicosanoides, lípidos

RESUMO

Os lipídios da dieta são fonte de ácidos graxos essenciais para o organismo humano, onde se encontram os ácidos linoléico e α -linolênico. Os ácidos graxos são importantes para o balanço energético, biossíntese de membranas, produção de eicosanóides e outras funções especializadas. Nos tecidos, os ácidos graxos podem ser oxidados a acetil-CoA (β -oxidação) ou esterificados a acilglicerol, onde como triacilglicerol constituem a forma mais eficiente de reserva calórica do organismo. Muitas das propriedades funcionais das membranas são influenciadas por ácidos graxos que compõem os fosfolípidos. Os ácidos graxos saturados diminuem a fluidez das membranas, enquanto os ácidos graxos poliinsaturados promovem maior fluidez. O presente trabalho tem como objetivo relatar os aspectos gerais que envolvem os diferentes ácidos graxos da dieta.

Palavras-chave: ácidos graxos *cis* e *trans*, eicosanóides, lipídios

INTRODUÇÃO

O tipo de gordura que compõe a dieta desempenha um papel importante no desenvolvimento de muitas doenças, como as doenças cardiovasculares, *diabetes mellitus* insulino não-dependente e alguns tipos de câncer. Tem sido demonstrado que uma elevação dos níveis de lipídios sanguíneos devido a um excesso de gordura consumida na dieta, pode levar a deposição de tecido adiposo, além da quantidade normal, e como conseqüência pode contribuir para o desenvolvimento de muitas doenças. Contudo, existem evidências que não simplesmente a quantidade de gordura consumida, mas também o tipo de gordura (saturada, monoinsaturada e/ou polinsaturada), e particularmente ácidos graxos específicos, são fatores importantes tanto na saúde como na carcinogênese humana (YAQOOB *et al*, 1995; WINTERBOURN *et al*, 1985).

ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídios da dieta originam-se de fontes animal, vegetal e marinha. Estruturalmente a maioria dos lipídios da dieta contém três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e é conhecida como triacilgliceróis (BELL *et al*, 1997).

Dependendo do tamanho da cadeia carbônica, do número e da posição das duplas ligações e linearidade (estereoespecificidade, *cis* e *trans*), os lipídios têm diferentes propriedades físicas e químicas. Os ácidos graxos apresentam diferentes tamanhos de cadeia de 3 a 24 átomos de carbono. Os ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados. Os ácidos graxos insaturados, por possuírem duplas ligações, são considerados quimicamente mais instáveis. Quando possuem apenas uma dupla ligação são denominados monoinsaturados; com duas ou mais duplas ligações, são chamados de polinsaturados (BELL *et al*, 1997).

NOMENCLATURA DOS ÁCIDOS GRAXOS

A nomenclatura química convencional é a sistemática, a qual inicia a numeração dos átomos de carbonos pelo grupo carboxila terminal. Os átomos de carbono de número 2 e 3 adjacentes ao grupo carboxila, são denominados de carbonos α e β , respectivamente, enquanto que o último carbono é o ω - ou n -carbono. A posição da dupla ligação é indicada pelo símbolo Δ , seguido por um número, por exemplo: Δ^9 se refere à dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 numerados a partir do grupo carboxila. Contudo, uma prática aceita é descrever a estrutura química das moléculas dos ácidos graxos iniciando pela numeração dos carbonos no grupo metil (ω - ou n -) (ROSE e CONNOLLY, 1999).

O ácido oléico tem uma dupla ligação localizada entre os carbonos 9 e 10 do grupo metil final, e é designado como ácido graxo monoinsaturado ω^9 (ou $n-9$). Este ácido graxo pode ser sintetizado por todos os mamíferos, incluindo humanos. Os ácidos graxos polinsaturados ω^3 ($n-3$) e ω^6 ($n-6$) não podem ser sintetizados pelos mamíferos,

por não possuírem a enzima $\Delta 9$ -dessaturase; portanto, eles devem ser obtidos da dieta (ROSE e CONNOLLY, 1999; TEITELBAUM e WALKER, 2001). Os ácidos graxos linoléico ($\omega 6$) e α -linolênico ($\omega 3$) são essenciais para funções celulares normais, e atuam como precursores para a síntese de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa como os ácidos araquidônico (AA), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que fazem parte de numerosas funções celulares como a integridade e fluidez das membranas, atividade das enzimas de membrana, interações lipídio-proteína e síntese de eicosanóides como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (Figura 1) (YOU DIM *et al*, 2000).

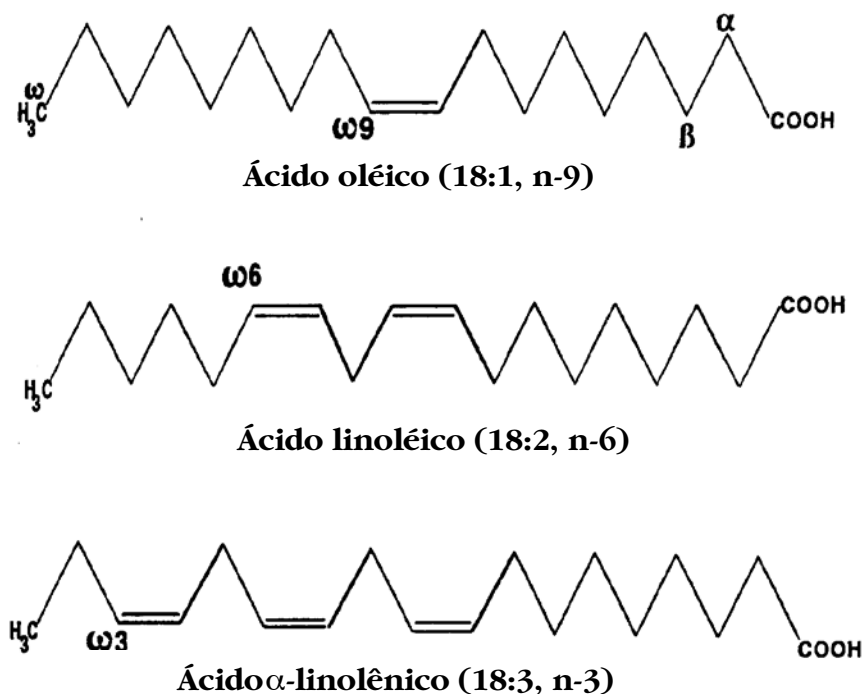


FIGURA 1 Estrutura do ácido oléico ($\omega 9$), ácido linoléico ($\omega 6$) e do ácido α -linolênico ($\omega 3$) (ROSE e CONNOLLY, 1999).

DIGESTÃO, ABSORÇÃO E METABOLISMO DAS GORDURAS DA DIETA

Após hidrólise na cavidade oral e no estômago, os lipídios da dieta são emulsificados no duodeno com a ajuda dos ácidos biliares. Os lipídios e os sais biliares interagem para formar as micelas. As micelas são formadas por triacilgliceróis, ésteres de colesterol e fosfolipídeos, que são digeridos com ajuda da lipase e colipase, subseqüentemente, os lipídios digeridos entram passivamente nos enterócitos. Os ácidos graxos de cadeia curta são transportados no sangue ligados à albumina. A absorção dos ácidos graxos polinsaturados para dentro dos enterócitos é facilitada por uma “proteína ligante de ácidos graxos” (FABP). A FABP é uma pequena proteína que tem grande afinidade por

ácidos graxos de cadeia longa. Após absorção, os ácidos graxos de cadeia longa são esterificados novamente a triacilglicerol por aciltransferases, e são liberados na circulação linfática como quilomícrons (WOUTERSEN *et al*, 1999).

Todos os mamíferos podem sintetizar ácidos graxos *de novo* a partir da acetil coenzima A. O produto final da enzima sintetase de ácidos graxo é o ácido palmítico (16:0), que pode ser elongado para ácido esteárico (18:0). Este ácido graxo com 18 átomos de carbono é muito importante para a síntese de ácidos graxos insaturados. A introdução de uma dupla ligação entre os átomos de carbonos 9 e 10 é catalisada pela enzima Δ -9 dessaturase. Esta enzima está presente em plantas e animais, e converte o ácido esteárico para o ácido oléico (Figura 2) (CALDER, 1998; TEITELBAUM e WALKER, 2001). Portanto, o ácido oléico (18:1) não é um ácido essencial, consequentemente, pode competir com os ácidos linoléico e α -linolênico e seus produtos intermediários, para as reações mediadas por dessaturases e elongases (WOUTERSEN *et al*, 1999). Nas plantas, a enzima Δ -12 dessaturase converte o ácido oléico em ácido linoléico e a Δ -15 dessaturase converte o ácido linoléico em ácido α -linolênico (CALDER, 1998; TEITELBAUM e WALKER, 2001).

Nas células animais os ácidos linoléico e α -linolênico sofrem dessaturação e elongação das cadeias, nos quais eles competem pelas enzimas elongases e Δ 6-, Δ 5- e Δ 4-dessaturases. O ácido linoléico é dessaturado e elongado ao ácido dihomo- γ -linolênico (20:3) e subseqüentemente, dessaturado ao ácido araquidônico (20:4). O ácido α -linolênico é dessaturado e elongado para o ácido eicosapentaenóico (20:5) e

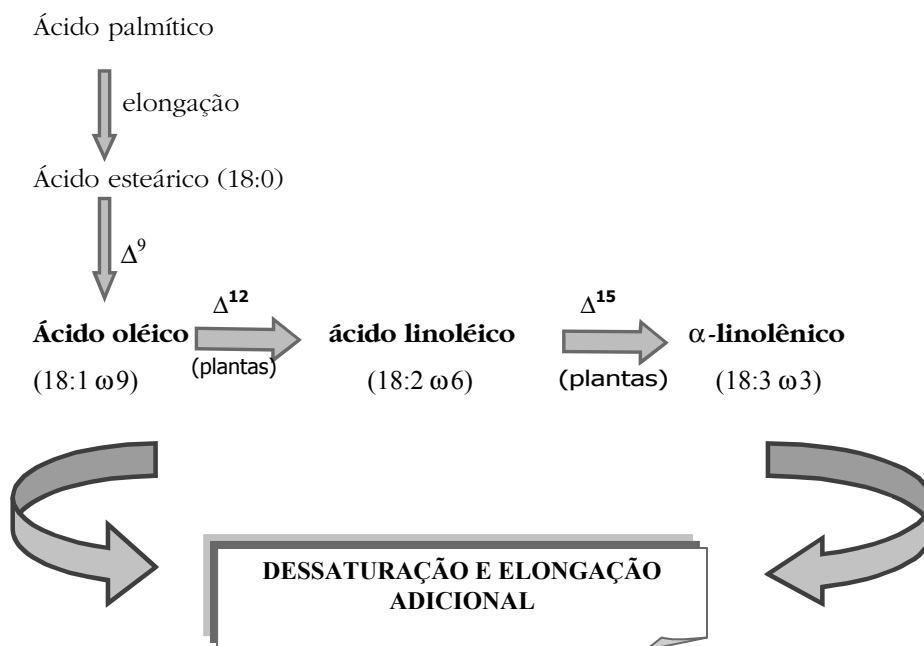


FIGURA 2 Biossíntese dos ácidos graxos (CALDER, 1998).

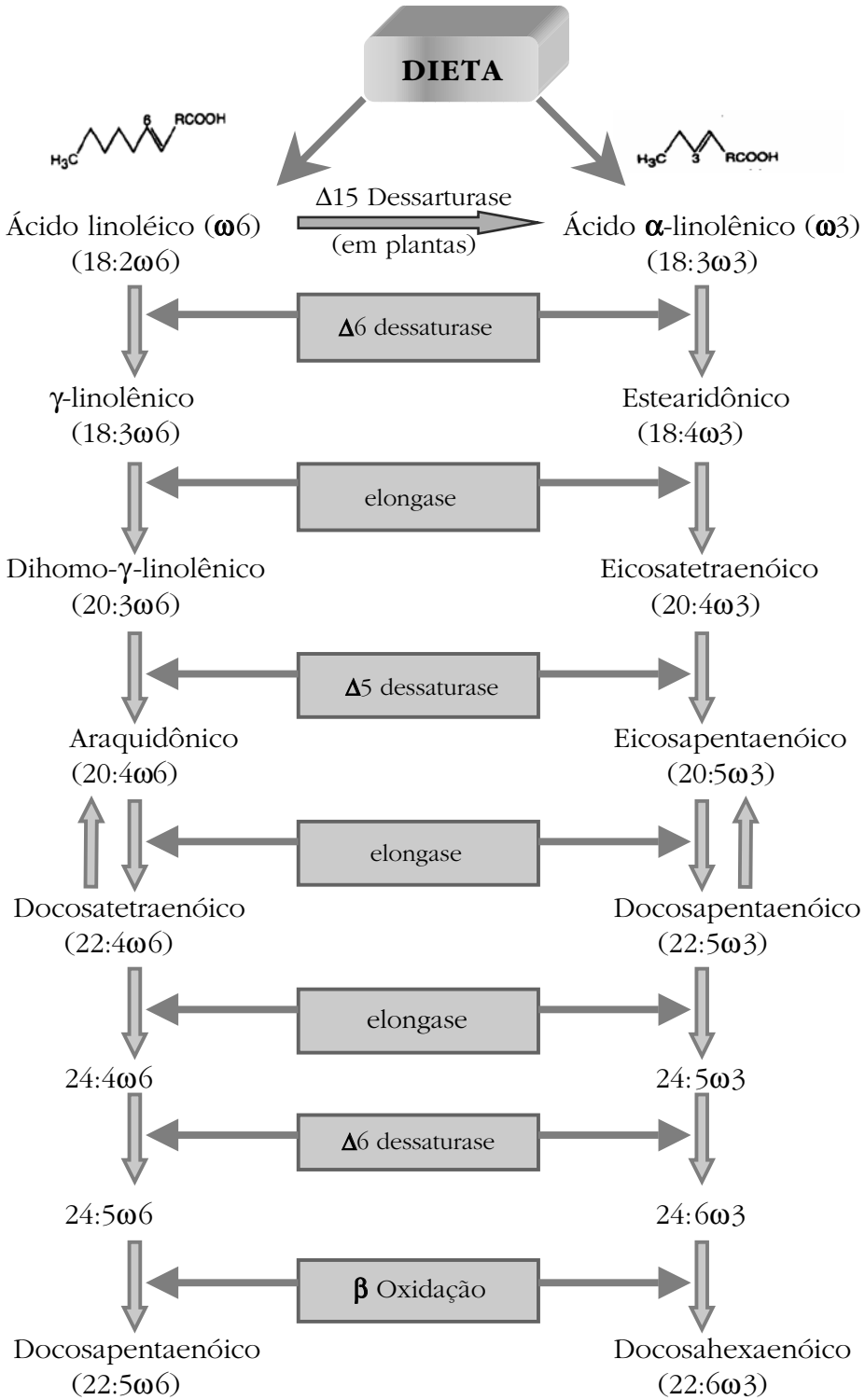


FIGURA 3 Vias da biossíntese dos ácidos graxos polinsaturados (CALDER, 1998; YODIM *et al*, 2000; TEITELBAUM e WALKER, 2001).

docosahexaenóico (22:6). Os processos enzimáticos de dessaturação e alongação dos ácidos graxos são localizados principalmente na fração microsomal do fígado. A dessaturação dos ácidos graxos ω_3 é um pouco mais efetiva que a dos ácidos graxos ω_6 , onde a enzima $\Delta 6$ -dessaturase atua preferencialmente nos ácidos graxos ω_3 (WOUTERSEN *et al*, 1999; TEITELBAUM e WALKER, 2001). O ácido linoléico é encontrado abundantemente nas sementes da maioria das plantas e é o ácido graxo polinsaturado predominante na dieta ocidental. Muitas plantas marinhas (especialmente algas unicelulares) e alguns óleos de peixes marinhos são ricos em EPA e DHA, que são os produtos de alongação e dessaturação do ácido α -linolênico (Figura 3) (TEITELBAUM e WALKER, 2001).

BIOSSÍNTESE DOS EICOSANÓIDES

Uma vez ingeridos, os ácidos linoléico e α -linolênico podem ser dessaturados e alongados ao AA (20:4 ω_6), EPA (22:5 ω_3) e DHA (22:6 ω_3), respectivamente. O AA e o EPA presentes nas membranas celulares podem ser metabolizados via lipoxigenases e ciclooxigenases para formar os eicosanóides (MANTZIORIS *et al*, 1995).

Os eicosanóides são uma família de compostos com 20 átomos de carbono, apresentando oxigênio na estrutura e são derivados dos ácidos dihomo- γ -linolênico, araquidônico e eicosapentaenóico. Os eicosanóides incluem prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), os quais são denominados de prostanóides, bem como os leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs), ácidos hidroperoxieicosatetraenóico (HPETEs), e ácidos hidroxieicosatetraenóico (HETEs). O principal precursor destes compostos é o AA. Os eicosanóides produzidos a partir do AA têm funções biológicas mais potentes que aqueles dos ácidos dihomo- γ -linolênico ou do EPA (MANTZIORIS *et al*, 1995; ROSE e CONNOLLY, 1999; LONG e ORLANDO, 2000; TEITELBAUM e WALKER, 2001).

A síntese das PGs inicia-se com a hidrólise do AA e de outros ácidos graxos polinsaturados com 20 átomos de carbono na posição sn-2 dos fosfolipídeos (YOUUDIM *et al*, 2000). O ácido graxo polinsaturado precursor é liberado das membranas fosfolipídicas, pela ação da enzima fosfolipase A2 na fosfatidilcolina ou pelas ações da fosfolipase C (PC) e da lipase diacilglicerol (DAG) no fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2). A síntese dos eicosanóides inicia-se com a via da cicloxigenase, que converte o AA em endoperóxidos cíclicos, uma molécula precursora na síntese das prostacilinas (PGI_2), um potente vasodilatador, e TXA_2 , um potente vasoconstrictor, e outras prostaglandinas (PGE_{2a} , PGF_2 e PGD_2), ou pela via da 5-, 12-, ou 15-lipooxigenase que fornece LTs, HPETEs, HETEs e LXs (MANTZIORIS *et al*, 1995; ROSE e CONNOLLY, 1999; YOUUDIM *et al*, 2000; TEITELBAUM e WALKER, 2001;). As lipoxigenases são di-oxigenases que incorporam oxigênio molecular em posições específicas dentro dos ácidos graxos polinsaturados; baseadas nos sítios de inserção do oxigênio são classificadas como 5-, 12- ou 15-lipoxigenases. A lipoxigenase catalisa a adição de uma molécula de oxigênio convertendo o AA em produtos oxigenados (leucotrienos), que possuem potentes propriedades biológicas. O principal metabólito produzido desta enzima é o 12-hidroxieicosatetraenóico

(12-HETE). Quando o AA é oxidado pela 5-lipoxigenase, o produto resultante é o ácido 5(S)-hidroperoxieicosatetraenóico-6,8,11,14 (5-HPETE) (YOUNDIM *et al*, 2000).

Durante a formação das PGs existe uma competição entre as duas diferentes classes de ácidos graxos polinsaturados. O EPA e DHA competem com o AA pela ação da cicloxigenase e da lipoxigenase para síntese de PGs e LTs. O AA é o precursor de duas séries de prostanóides (PGA₂, PGE₂, PGI₂ [prostaciclina], PGF_{2a}, e TXA₂) e dos leucotrienos da série 4 (LTB₄). O EPA fornece as PG e TXs da série 3, e LT da série 5, estes são tipicamente, menos ativos que os seus produtos correspondentes do AA

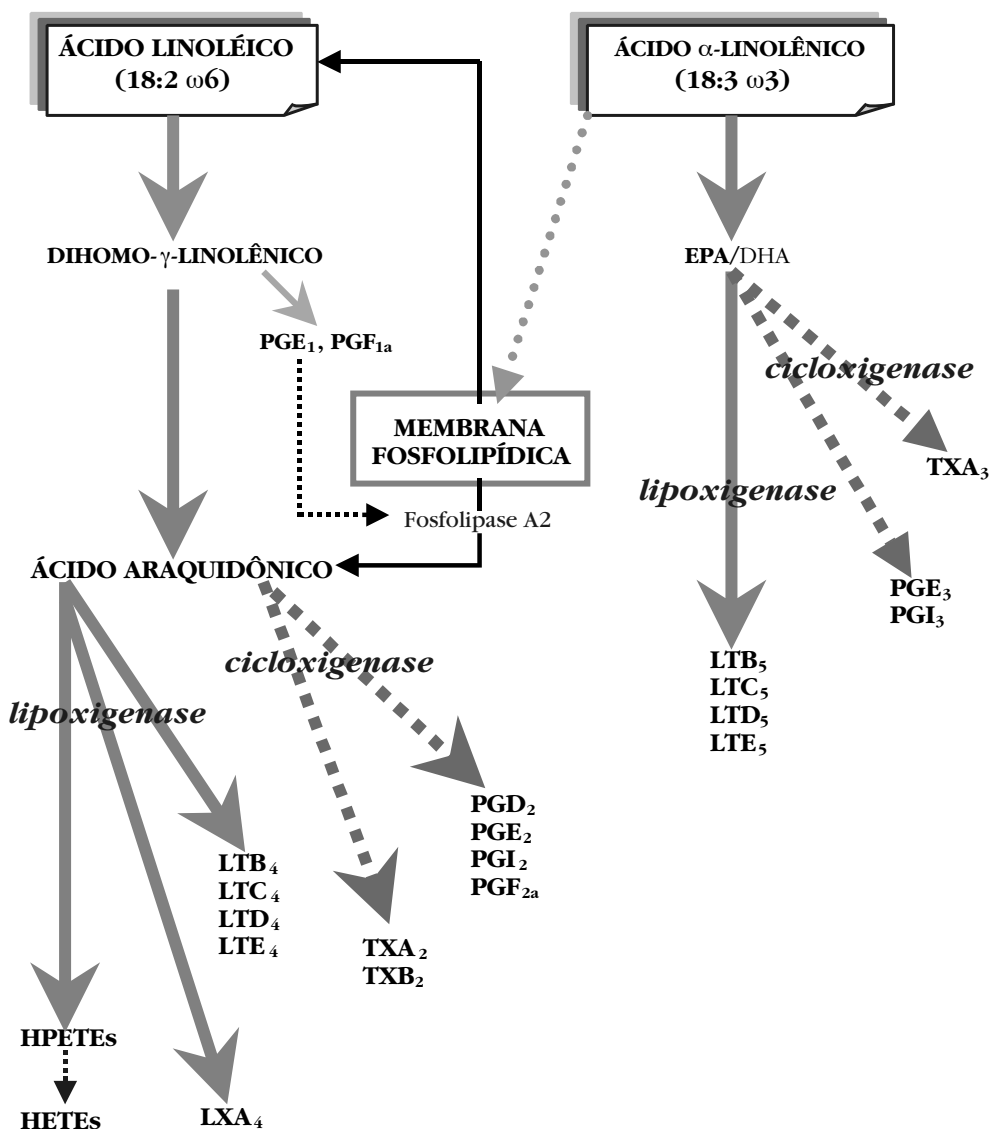


Figura 4 Biossíntese dos eicosanóides do ácido araquidônico e do EPA (YOUNDIM *et al*, 2000; ROSE e CONNOLLY, 1999; CALDER, 1998; KINSELLA *et al*, 1981).

(TEITELBAUM e WALKER, 2001; MANTZIORIS *et al*, 1995). Estes compostos têm tempo de vida curta e ação imediata na proximidade da célula em que foram produzidos. A produção deles é iniciada por um estímulo específico (TEITELBAUM e WALKER, 2001).

Os eicosanóides derivados do AA são potentes agentes pró-inflamatórios e pró-agregatórios (MANTZIORIS *et al*, 1995). *In vivo* as PGs estão envolvidas na modulação e na intensidade da resposta imune. As TXA2 são potentes agentes agregadores plaquetários e vasoconstrictores. No entanto, as TXA3 são compostos que apresentam pequena atividade tanto na agregação plaquetária quanto na vasoconstricção. Já a PGI3 apresenta elevada atividade vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária. Os LTB5 são fracos agentes quimiotáxicos (Figura 4). O tipo e a quantidade de eicosanóides produzidos dependem do tipo de lipídio ingerido na dieta e da presença ou ausência de injúria ou inflamação tecidual (ROSE e CONNOLLY, 1999; YODIM *et al*, 2000; LONG e ORLANDO, 2000).

ÁCIDOS GRAXOS TRANS

Os ácidos graxos insaturados em vegetais e tecidos animais tipicamente têm a configuração *cis* (MENSINK e KATAN, 1993). Os ácidos graxos *trans* (AT) são formados durante o processo de hidrogenação parcial dos óleos vegetais. Os AT são também encontrados em níveis menores nas carnes e nos produtos lácteos como um resultado da biohidrogenação realizada pela fermentação bacteriana dos animais ruminantes. Os AT são raramente encontrados nas plantas (LICHTENSTEIN *et al*, 2001). O aquecimento de óleos vegetais também induz à formação de isômeros geométricos dos ácidos graxos polinsaturados (CHARDIGNY *et al*, 1997; SANIBAL, 2001), da mesma forma que a irradiação de alimentos (BRITO *et al*, 2002).

A hidrogenação de óleos vegetais foi introduzida nos Estados Unidos em 1910. Um pouco antes da Segunda Guerra Mundial, as margarinas foram produzidas em larga escala a partir da mistura de óleo de coco, gordura animal ou banha de porco. A partir de 1940, iniciou-se a utilização da hidrogenação de óleos vegetais na produção de gorduras sólidas. No início de 1950, a indústria de alimentos utilizou largamente as gorduras sólidas na produção de biscoitos, bolos e nos produtos de panificação (ZOCK e MENSINK, 1996).

Durante o processo de hidrogenação parcial, os óleos são aquecidos na presença do níquel ou de outro metal catalítico e exposto ao gás hidrogênio. Este processo é freqüentemente feito para aumentar a estabilidade e diminuir a viscosidade para subsequente uso em produtos alimentares. Algumas das duplas ligações *cis* são convertidas para duplas ligações *trans*. Outra mudança que ocorre durante o processo de hidrogenação é a migração de algumas duplas ligações ao longo da cadeia acil, formando múltiplos isômeros posicionais, além de formar ácidos graxos saturados (ZOCK e MENSINK, 1996; ASCHERIO e WILLETT, 1997; LICHTENSTEIN *et al.*, 2001).

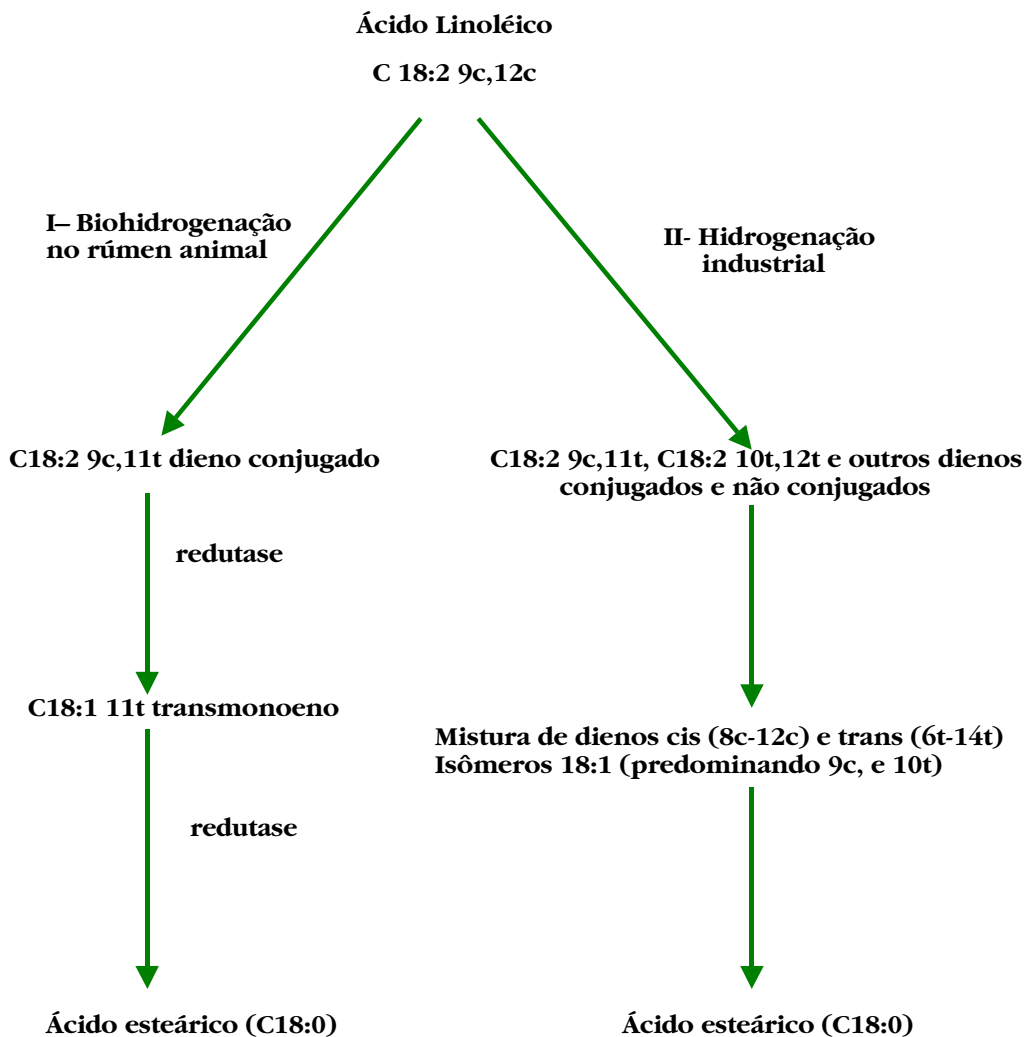


FIGURA 5 Hidrogenação dos ácidos graxos por biohidrogenação e por processo industrial (MANCINI-FILHO e CHEMIN, 1996).

Os altos níveis de ácidos graxos polinsaturados dos óleos vegetais da dieta são extremamente vulneráveis a autooxidação. Esta característica limita o tempo de vida útil quando há exposição ao ar e causa problemas na distribuição e armazenamento dos óleos e dos produtos que os contêm. A hidrogenação parcial dos óleos vegetais produz gorduras com propriedades físicas desejáveis, diminuindo a rancidez e aromas não desejáveis, aumentando a vida de prateleira, tornando disponíveis gorduras mais baratas em grande escala; no entanto, diminui o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, e aumenta os ácidos graxos saturados como também os isômeros *cis* e *trans* dos ácidos monoenoícos, a maioria dos quais são raros na natureza e o metabolismo, não muito bem conhecido (LICHTENSTEIN *et al*, 2001).

Quando os ácidos graxos insaturados *cis* são alterados pela hidrogenação parcial, ficam com algumas propriedades dos ácidos graxos saturados. Os ácidos graxos *trans* são ácidos graxos insaturados com pelo menos uma dupla ligação na configuração *trans*. Os ácidos graxos *trans* são do mesmo tamanho e peso molecular do ácido graxo *cis* que os originou, apresentando o mesmo número de carbonos, hidrogênios e oxigênios, mas com diferente conformação espacial (ALMENDINGEN *et al*, 1995; MANCINI-FILHO, 2001).

Os ácidos graxos *trans* mais comuns de óleo de peixe, são os monoinsaturados, mas vários isômeros diinsaturados *trans,trans-*, *cis,trans-*, *trans,cis-* e os isômeros trienóicos ou mais insaturados podem ser formados, mas em menores quantidades (ALMENDINGEN *et al*, 1995). Os AT predominantes nos alimentos são os ácidos 18:1-9*t*, 18:1-10*t* e 18:1-11*t*, que são os isômeros presentes nos óleos parcialmente hidrogenados (VIDGREN *et al*, 1998).

Os ácidos graxos *trans* estão entre os ácidos graxos saturados e os insaturados *cis*. O número, a geometria, e a posição das duplas ligações nos ácidos graxos interferem no ponto de fusão. O ácido oléico (18:1-9*c*), tem ponto de fusão 13°C, seu isômero, o ácido elaídico, (18:1-9*t*), 44°C, e o ácido esteárico (18:0), 72°C (Figura 6) (ASCN/AIN, 1996; VALENZUELA e MORGADO, 1999).



R, R' Cadeia hidrocarbonada

FIGURA 6 Isomeria *cis-trans* dos ácidos graxos

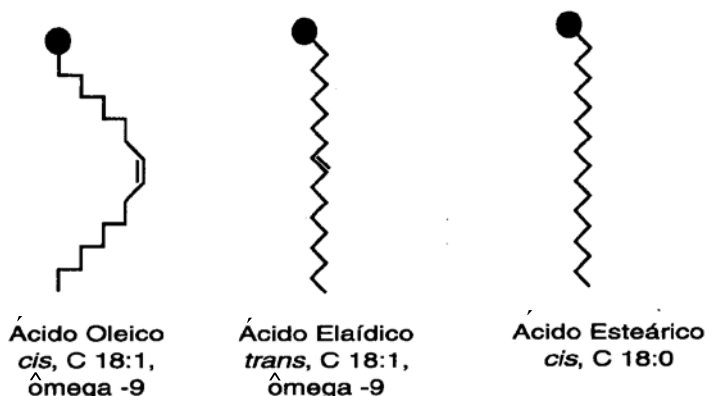


FIGURA 7 Estrutura esquemática dos isômeros *cis* e *trans* em comparação com a estrutura de um ácido graxo saturado (ROSE e CONNOLLY, 1999).

Os principais ácidos graxos *trans* polinsaturados encontrados em óleos vegetais e óleos de fritura são os 18:2-9*c*,12*t* e 18:2-9*t*, 12*c*, formados a partir do ácido linoléico (18:2 9*c*,12*c*). Os isômeros do ácido α -linolênico (18:3-9*c*,12*c*,15*c*) são principalmente os 18:3-9*t*,12*c*,15*c*, 18:3-9*c*,12*c*,15*t* e 18:3-9*t*,12*c*,15*t*. Estes compostos são desaturados e alongados em isômeros *trans* dos ácidos araquidônico e eicosapentaenóico (20:5-5*c*,8*c*,14*c*,17*t*; 20:5-5*c*,8*c*,11*t*,14*c*,17*c* e 20:5-5*c*,8*c*,11*t*,14*c*,17*t*) (CHARDIGNY *et al*, 1997; LOÏ *et al*, 2000; BRETILLON *et al*, 1998).

METABOLISMO DOS ÁCIDOS GRAXOS TRANS

Os ácidos graxos *trans* são rapidamente absorvidos e incorporados na maioria dos tecidos dos mamíferos, incluindo os humanos, em concentrações que aparentemente refletem o conteúdo dos mesmos na dieta (KINSELLA *et al*, 1981; MANCINI-FILHO e CHEMIN, 1996). Os AT competem com o metabolismo dos ácidos graxos essenciais, pela inibição da incorporação na membrana fosfolipídica e pela redução da conversão dos ácidos graxos essenciais para os eicosanóides em diferentes células animais. A ingestão dos isômeros *trans* altera a agregação plaquetária e a função vascular (ASCHERIO *et al*, 1994; VALENZUELA e MORGADO, 1999).

Várias funções da membrana são dependentes da composição lipídica. Assim, a ingestão de gordura através da dieta pode modificar a composição e a atividade bioquímica das membranas celulares (MORGADO *et al*, 1998; IBRAHIM e GHAFORUNISSA, 2001). Os AT são incorporados nas membranas lipídicas, sofrem o processo de absorção e deste modo afetam as propriedades físicas das membranas das células (MAHFOUZ *et al*, 1980; SHIMP *et al*, 1982).

Os AT, provavelmente, seguem as mesmas vias bioquímicas, semelhantes aos ácidos graxos essenciais (BRETILLON *et al*, 1998). Os AT inibem a enzima $\Delta 6$ -dessaturase, que catalisa o estágio inicial da taxa limitante da dessaturação do ácido linoléico e do ácido α -linolênico, enquanto que nos óleos marinhos, pela presença de EPA e DHA, ocorre a inibição das enzimas $\Delta 5$ e $\Delta 6$ -dessaturases (KIRSTEIN *et al*, 1983; MAHFOUZ e KUMMEROW, 1999).

BRETILLON *et al* (1998) demonstraram que, por comparação com o ácido linoléico, a geometria *trans* na posição $\Delta 12$ aumenta significativamente a dessaturação dos ácidos graxos precursores, embora a geometria *trans* na posição $\Delta 9$ aumente a alongação. A respeito do ácido graxo α -linolênico (18:3 $\omega 3$), a geometria *trans* na posição $\Delta 15$ somente diminuiu a dessaturação dos ácidos graxos, enquanto que a geometria na posição $\Delta 9$ tanto aumentou a dessaturação como a alongação dos precursores.

MAHFOUZ e KUMMEROW (1999) verificaram que o consumo de gordura hidrogenada rica em ácido graxo elaídico (18:1 9*t*), na presença adequada de ácido linoléico (18:2 9*c*, 12*c*), pode ainda diminuir o nível de ácido araquidônico nos fosfolipídeos dos tecidos. Contudo, a diminuição no conteúdo de ácido araquidônico não afetou a quantidade de tromboxano (TX2) ou prostaglandinas 2 (PGE2), produzidos *in vitro* por

plaquetas e aorta, respectivamente. Este mesmo estudo também mostrou que dieta deficiente em ácidos graxos essenciais e que contém altos níveis de AT não aumentou a atividade da enzima prostaglandina sintetase.

Os AT comportam-se semelhantemente aos ácidos graxos saturados, e estão preferencialmente incorporados na posição 1 dos fosfolipídeos, substituindo os ácidos graxos saturados. Um aumento moderado de AT na dieta resulta em uma expressiva incorporação nos triacilgliceróis plasmáticos e nos fosfolipídeos, e em menor grau nos ésteres de colesterol. Os AT em uma concentração de 5% do total de energia da dieta diminuem a conversão do ácido linoléico para os metabólitos de cadeias mais longas e mais insaturados. A presença do ácido 18:1 *9t* nos triacilgliceróis e nos fosfolipídeos dos tecidos reflete seguramente a ingestão deste ácido graxo pela dieta (VIDGREN *et al*, 1998; BYSTED *et al*, 1998).

Muitos dos efeitos dos isômeros *trans* em animais são resultados de uma deficiência dos ácidos graxos essenciais, mais que um efeito de um isômero *trans* específico, portanto, isto pode ser prevenido por um aumento da disponibilidade dos ácidos graxos essenciais (MAHFOUZ e KUMMEROW, 1999).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que isômeros *trans* de ácidos graxos, semelhante aos *cis* sofrem oxidação e esterificação nos tecidos animais. A taxa de oxidação dos AT parece ser influenciada pela característica tecidual e do sistema experimental empregado. IDE e SUGANO (1986) observaram em fígados intactos que a oxidação dos AT não foi necessariamente menor que dos ácidos graxos *cis*.

Os isômeros *trans* dos ácidos graxos essenciais são utilizados para a produção de energia em humanos de forma semelhante aos seus isômeros *cis*. Os efeitos metabólicos dos ácidos graxos polinsaturados *trans* podem ser modulados pela biodisponibilidade dos mesmos e influenciar a metabolização dos ácidos graxos essenciais (linoléico e α -linolênico) (BRETILLON *et al*, 2001).

ISÔMEROS CONJUGADOS DO ÁCIDO LINOLÉICO (CLA)

Os ácidos octadecadienóico conjugados são um grupo de isômeros de posição e geométricos do ácido linoléico (C18:2 ω -6). Eles são conhecidos como ácido linoléico conjugado (CLA), e suas duplas ligações são separadas por uma ligação simples carbono-carbono (insaturação conjugada), em vez da interrupção usual da estrutura metilênica no sistema de duplas ligações. Os isômeros CLA incluem isomeria geométrica *cis-cis*, *cis-trans*, *trans-cis* e *trans-trans*, e isomeria com as duplas ligações nas posições 9 e 11, 10 e 12 ou 11 e 13 (Figura 7) (BESSA *et al*, 2000).

O isômero natural predominante em humanos e animais é o ácido octadecadienóico 9*c*,11*t*, denominado ácido rumênico. Este ácido é considerado como o CLA biologicamente mais ativo, por ele ser predominantemente incorporado nas membranas fosfolipídicas (HA *et al*, 1990; SALMINEN *et al*, 1998).

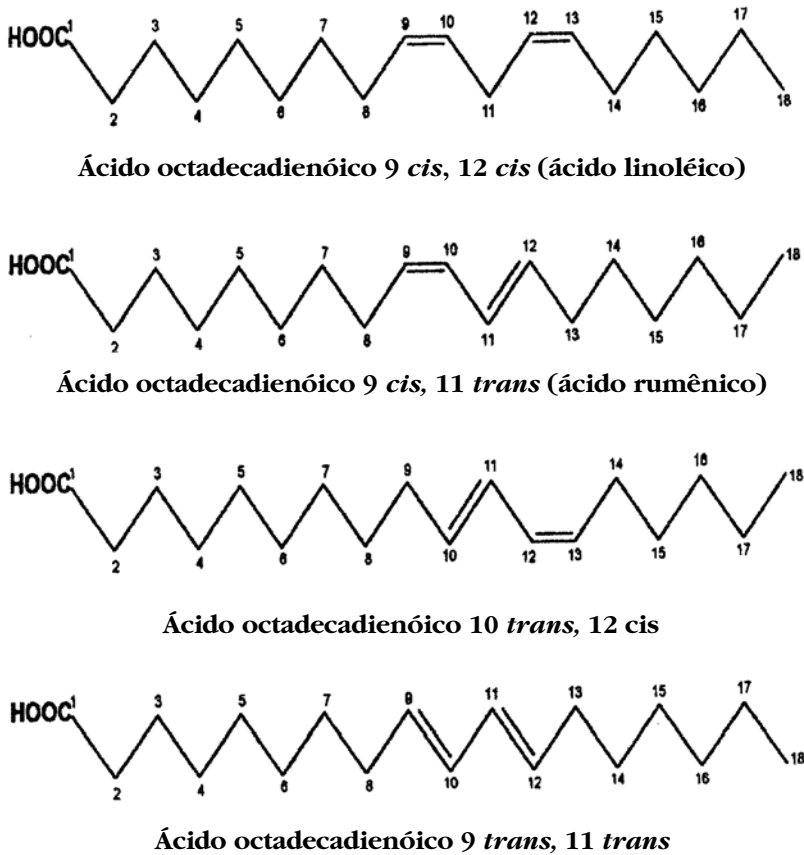


FIGURA 8 Principais isômeros conjugados do ácido linoléico (BESSA *et al*, 2000).

Em bovinos os CLA são formados durante a hidrogenação enzimática do ácido linoléico pelos microrganismos do rúmen. O estágio inicial envolve a isomerização do ácido linoléico para a forma dienóica conjugada 9*c*,11*t*. Contudo, muitos dos CLA produzidos no rúmen são utilizados para reduzir preferencialmente a dupla ligação 9*cis* para formar o ácido *trans* vacênico (LOOR e HERBEIN, 1998).

Os CLA são particularmente encontrados em produtos de origem animal e têm sido identificados nos tecidos humanos incluindo sangue, bile, tecido adiposo e leite. O isômero 9*c*,11*t* representa mais de 95% dos dienos conjugados nos tecidos humanos (SALMINEN *et al*, 1998). Em ratos, os CLA podem ser produzidos por biohidrogenação do ácido linoléico livre pela flora intestinal ou possivelmente através da dessaturação do ácido *trans*-vacênico (C18:1-11*t*) nos microsomas do fígado (POLLAR *et al*, 1980).

HA *et al* (1987) isolaram os isômeros CLA e observaram que os mesmos apresentavam atividade anticarcinogênica. Desde então, a ação inibitória dos CLA foi observada em vários modelos de carcinogênese, incluindo epidérmica (HA *et al*, 1987; BELURY *et al*, 1996), mamária (IP *et al*, 1991, 1994,1999; THOMPSON *et al*, 1997) e carcinomas

gastrointestinais (HÁ *et al*, 1990; LIEW *et al*, 1995). Os CLA também foram efetivos na redução do tamanho e da metástase de células de câncer de mama humano (CESANO *et al*, 1998). O efeito anticarcinogênico dos CLA parece ser dose dependente de 0.1 a 1% na dieta (IP *et al* 1991; IP *et al*, 1994).

Em modelos experimentais tem-se atribuído aos CLA ação protetora na redução do câncer e da aterosclerose, na estimulação de certas funções imunes, na redução da massa gordurosa, e na normalização da tolerância a glicose em diabéticos. Contudo, poucas informações estão disponíveis sobre seus mecanismos de ação (RAHMAN *et al*, 2001; BANNI *et al*, 2001).

Os mecanismos de ação dos CLA na modulação da carcinogênese incluem: rápida incorporação nas membranas fosfolipídicas das células e a substituição dos ácidos graxos polinsaturados pelos CLA, afetando reações que conduzem ao estresse oxidativo, a transdução de sinais, a diminuição na síntese de eicosanóides, a modulação da resposta imune e a supressão da proliferação celular (BELURY, 1995; IGARASHI e MIYAZAWA, 2001).

PADOVESE e MANCINI-FILHO (2002) destacaram a importância da realização de mais estudos sobre ácidos graxos *trans* no metabolismo humano e animal, já que devido ao elevado número de diferentes isômeros formados durante a hidrogenação, existem compostos que tanto podem induzir o surgimento de problemas cardíacos, como aqueles que podem participar de processos que levam à inibição da carcinogênese.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As gorduras da dieta constituem uma das principais prioridades na pesquisa, devido à associação destas com doenças do coração, câncer e outras doenças. Os lipídios têm sido identificados como compostos moduladores das funções celulares, como determinantes da estrutura de membranas, como ligantes de receptores de superfície de células. Além de estarem envolvidos em muitas funções metabólicas do organismo humano e animal, participando da formação de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanas e outros compostos bioativos responsáveis pela regulação das funções celulares. Muitas funções das membranas são dependentes da composição lipídica e os lipídios ingeridos através da dieta podem modificar a composição e a atividade bioquímica das mesmas. Os mecanismos biológicos dos efeitos dos lipídios nos vários tipos de patologias são pouco entendidos. No entanto, evidências sugerem que a alta ingestão de gordura altera o balanço endócrino, a modulação do tipo e da quantidade de eicosanóides produzidos, modificando a expressão gênica e a fluidez da membrana, alterando o metabolismo de energia, e/ou as funções imunológicas. Portanto, é importante a realização de mais pesquisas nesta área para elucidar os mecanismos de ação dos diferentes tipos de ácidos graxos sobre as células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCE

- ALMENDINGEN, K.; JORDAL, O.; KIERULF, P.; SANDSTAD, B.; PEDERSEN, J.I. Effects of partially hydrogenated fish oil, partially hydrogenated soybean oil, and butter on serum lipoproteins and Lp[a] in men. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.26, p.1370-1384, 1995.
- ASCHERIO, A.; HENNEKENS, C.; BURING, J.; MATER, C.; STAMPER, M.; WILLET, W. *Trans* fatty acids intake and risk of myocardial infarction. *Circulation*, Baltimore, v.89, p. 94-101, 1994.
- ASCHERIO, A.; WILLETT, C. Health effects of *trans* fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.66, p.1006S-1010S, 1997.
- ASCN/AIN Task force on *trans* fatty acids: position paper on *trans* fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.63, p.663-670, 1996.
- BANNI, S.; ANGIONI, E.; CONTINI, M.S.; CARTA, G.; CASU, V.; LENGU, G.A.; MELIS, M.P.; DEIANA, M.; DESSÌ, M.A.; CORONGIU, F.P. Conjugated linoleic acid and oxidative stress. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.75, p.261-267, 1998.
- BANNI, S.; CARTA, G.; ANGIONI, E.; MURRU, E.; SCANU, P.; MELIS, M.P.; BAUMAN, D.E.; FISCHER, S.M.; IP, C. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.42, p.1056-1061, 2001.
- BELL, S.J.; BRADLEY, D.; FORSE, R.A.; BISTRIAN, B.R. The new dietary fats in health and disease. *J. Am. Diet. Assoc.*, Chicago, v.97, p.280-286, 1997.
- BELURY, M.A. Conjugated dienoic linoleate: a polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties. *Nutr. Rev.*, Secaucus, v.53, p.83-89, 1995.
- BELURY, M.A.; NICKEL, K.P.; BIRD, C.E.; WU, Y. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr. Cancer*; Mahwah, v.26, p.149-157, 1996.
- BESSA, R.J.B.; SANTOS-SILVA, J.; RIBEIRO, J.M.R.; PORTUGAL, A.V. Reticulo-rumen biohydrogenation and enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livest. Prod. Sci.*, Amsterdam, v.63, p.201-211, 2000.
- BRETILLON, L.; CHARDIGNY, J.M.; SÉBÉDIO, J.L.; POUILLAIN, D.; NOËL, J.P.; VATÈLE, J.M. Oxidative metabolism of [1-¹⁴C] mono-*trans* isomers of linoleic and α -linolenic acids in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1390, p.207-214, 1998.
- BRITO, M.S.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H.; MANCINI-FILHO, J. Effects of irradiation on *trans* fatty acids formation in ground beef. *Radiat. Phys. Chem.*, Oxford, v. 63, p. 337-340, 2002.
- BYSTED, A.; HOLMER, G.; LUND, P. Influence of moderate amounts of *trans* fatty acids on the formation of polyunsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.75, p.225-234, 1998.
- CALDER, P.C. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.31, p.467-490, 1998.
- CESANO, A.; VISONNEAU, S.; SCIMECA, J.A.; KRITCHEVSKY, D.; SANTOLI, D. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res.*, Attiki, v.18, p.1429-1434, 1998.
- CHARDIGNY, J.M.; BLOND, J.P.; BRETILLON, L.; MAGER, E.; POUILLAIN, D.; MARTINE, L.; VATÈLE, J.M.; NOËL, J.P.; SÉBÉDIO, J.L. Conversion of 18:3 Δ^9 *cis*, 12*cis*, 15*trans* in rats liver microsomes. *Lipids*, Champaign, v.32, p.731-735, 1997.
- HA, Y.L.; GRIMM, N.K.; PARIZA, M.W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-latered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, Oxford, v.8, p.1881-1887, 1987.

- HA, Y.L.; STORKSON, J.M.; PARIZA, M.W. Inhibition of benzo(a) pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.*, Birmingham, v.50, p.1097-1101, 1990.
- IBRAHIM, S.A.; GHAFOORUNISSA. Influence of dietary partially hydrogenated fat high in *trans* fatty acids on lipid composition and function of intestinal brush border membrane in rats. *J. Nutr. Biochem.*, New York, v.12, p.116-120, 2001.
- IDE, T.; SUGANO, M. Oxidation and esterification of geometrical and positional isomers of octadecenoic acids in perfused rat liver. *J. Biochem.*, Tokyo, v.100, p.1561-1568, 1986.
- IGARASHI, M.; MIYAZAWA, T. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on a human hepatoma cell line, HepG2, is induced by a change in fatty acid metabolism, but not the facilitation of lipid peroxidation in the cells. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1530, p.162-171, 2001.
- IP, C. Review of the effects of *trans* fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.66, p.1523S-1529S, 1997.
- IP, C.; BANNI, S.; ANGIONI, E.; CARTA, G.; MCGINLEY, J.; THOMPSON, H.J.; BARBANO, D.; BAUMAN, D. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.129, p.2135-2142, 1999.
- IP, C.; CHIN, S.F.; SCIMECA, J.A.; PARIZA, M.W. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivate of linoleic acid. *Cancer Res.*, Birmingham, v.51, p.6118-6124, 1991.
- IP, C.; SINGH, M.; THOMPSON, H.J.; SCIMECA, J.A. Conjugated linoleic acid suppresses mammary gland in the rat. *Cancer Res.*, Birmingham, v.54, p.1212-1215, 1994.
- ISOMERIA *cis-trans* de los acidos grasos. *PUFA infocus*, México, n. 1, p.7, 1999.
- KINSELLA, J.E.; BRUCKNER, G.; MAI, J.; SHIMP, J. Metabolism of *trans* fatty acids with emphasis of the effects of *trans* on lipid composition: an overview. *Am. J. Clin.Nutr.*, Bethesda, v. 34, ,p. 2307-2318, 1981.
- KIRSTEIN, D.; HOY, C.-E.; HOLMER, G. Effect of dietary fats on the $\Delta 6$ - and $\Delta 5$ -desaturation of fatty acids in rat liver microsomes. *Br. J. Nutr.*, Wallingford, v.50, p.749-756, 1983.
- LICHTENSTEIN, A.H.; JAUHAINEN, M.; MCGLADDERY, S.; AUSMAN, L.M., JALBERT, S.M.; VILELLA-BACH, M.; EHNHOLM, C.; FROHLICH, J.; SCHAEFER, E.J. Impact of hydrogenated fat on high density lipoprotein subfractions and metabolism. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v.42, p.597-604, 2001.
- LIEW, C.; SHUT, H.A.J.; CHIN, S.F.; PARIZA, M.W.; DASHWOOD, R.H. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3methylimidazol[4,5-f]quinolin-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis*, Oxford, v.16, p.3037-3043, 1995.
- LÖI, L.; CHARDIGNY, J.-M.; ALMANZA, S.; LECLERE, L.; GINIS, C.; SÉBEDIO, J.-L. Incorporation and metabolism of dietary *trans* isomers of linolenic acid alter the fatty acid profile of rat tissues. *J. Nutr.*, Bethesda, v.130, p.2550-2555, 2000.
- LONG, J.D.; ORLANDO, R.C. Eicosanoids and the esophagus. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, New York, v.61, p.91-104, 2000.
- LOOR, J.J.; HERBEIN, J.H. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. *J. Nutr.*, Bethesda, v.128, p.2411-2419, 1998.

- MAHFOUZ, M.M.; JOHNSON, S.; HOLMAN, R.T. The effect of isomeric *trans* 18:1 acids on the desaturation of palmitic linoleic and eicosa-8,11,14-trienoic acids by rat liver microsomes. *Lipids*, Champaign, v.15, p.100-107, 1980.
- MAHFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A. Hydrogenated fat high in *trans* monoenes with an adequate level of linoleic acid has no effect on prostaglandin synthesis in rats. *J.Nutr.*, Bethesda, v. 129, p. 15-24, 1999.
- MANCINI-FILHO, J. Ácidos graxos *trans*: formação, detecção e implicações na saúde humana. In: *Ciência dos alimentos*, Campinas, v.II, cap. 44, p.166-168, 2001.
- MANCINI-FILHO, J.; CHEMIN, S. Implicações nutricionais dos ácidos graxos *trans*. *Óleos Grãos*, São Caetano do Sul, n.31, p.41-45, 1996.
- MANTZIORIS, E.; JAMES, M.J.; GIBSON, R.A.; CLELAND, L.G. Differences exist in the relationships between dietary linoleic and α -linolenic acids and their respective long-chain metabolites. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.61, p.320-324, 1995.
- MORGADO, N.; GALLEGUILLOS, A.; SANHUEZA, J.; GARRIDO, A.; NIETO, S., VALENZUELA, A. Effect of degree of hydrogenation of dietary fish oil on the *trans* fatty acid content and enzymatic activity of rat hepatic microsomes. *Lipids*, Champaign, v.33, p.669-673, 1998.
- PADOVESE, R.; MANCINI-FILHO, J. Ácidos graxos *trans*. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C., K.; PROCOPIO, J. *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*, Barueri: Manole, 2002. Cap.36, p.507-521.
- POLLAR, M.R.; GUNSTONE, F.D.; JAMES, A.T.; MORRIS, L.J. Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids*, Champaign, v.15, p.306-314, 1980.
- RAHMAN, S.M.; WANG, Y.-M.; YOTSUMOTO, H.; CHA, J.-Y.; HAN, S.-Y.; INOUE, S.; YANAGITA, T. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and β -oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition*, New York, v.17, p.385-390, 2001.
- ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol. Ther.*, New York, v.83, p.217-244, 1999.
- SALMINEN, I.; MUTANEN, M.; JAUHAINEN, M.; ARO, A. Dietary *trans* fatty acids increase conjugated linoleic acid levels in human serum. *J. Nutr. Biochem.*, New York, v.9, p.93-98, 1998.
- SANIBAL, E.A.A. Avaliações física, químicas e sensoriais de óleos e gordura de soja no processo de fritura. São Paulo, 2001. 100p. Dissertação. (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP.
- SHIMP, J.L.; BRUCKNER, G.; KINSELLA, J.E. The effects of dietary trilinoleation on fatty acid and acyl desaturases in rat liver. *J. Nutr.*, Bethesda, v.4, p.722-735, 1982.
- TEITELBAUM, J.E.; WALKER, W.A. Review: The role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *J. Nutr. Biochem.*, New York, v.12, p.21-32, 2001.
- THOMPSON, H.; ZHU, Z.; BANNI, S.; DARCY, K.; LOFTUS, T.; IP, C. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res.*, Birmingham, v.57, p.5067-5072, 1997.
- VALENZUELA, A.; MORGADO, N. *Trans* fatty acid isomers in human health and in the food industry. *Biol. Res.*, Santiago, v.32, p.273-287, 1999.

- VIDGREN, H.M.; LOUHERANTA, A.M.; AGREN, J.J.; SCHWAB, U.S.; USITUPA, M. Divergent incorporation of dietary *trans* fatty acids in different serum lipid fractions. *Lipids*, Champaign, v.33, p.955-962, 1998.
- WINTERBOURN, C.C.; GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWEL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. *J. Free Radical Biol. Med.*, New York, v.1, p.43-49, 1985.
- WOUTERSEN, R.A.; APPEL, M.J.; GARDEREN-HOETMER, A; VAN, WIJNANDS, M.V.W. Dietary fat and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.443, p.111-127, 1999.
- YAQOOB, P.; SHERRINGTON, E. J.; JEFFERY, N. M.; SANDERSON, P.; HARVEY, D. J.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, London, v.27, n.3, p.297-310, 1995.
- YOU DIM, A.K.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. Essential fatty acids the brain: possible health implications. *Int.J. Dev. Neurosci.*, Oxford, v.18, p.383-399, 2000.
- ZOCK, PL; MENSINK, R.P. Dietary *trans*-fatty acids and serum lipoproteins in humans. *Curr. Opin Lipidol*, v.7, n.1, p.34-37, 1996.

Recebido para publicação em 25/08/02. Aprovado em 06/12/02.

Reações adversas a alimentos e imunidade humoral: subclasses de IgG a antígenos alimentares

Adverse reactions to food and humoral immunity: IgG subclasses to dietary antigens

ABSTRACT

ZANIN, C.M.; MARCHINI, J.S.; CARVALHO, I.F.; Adverse reactions to food and humoral immunity: IgG subclasses to dietary antigens. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = *J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP., v.24, p.125-134, dez., 2002

The matter of adverse reactions to food has been increasingly discussed by the public health due to the concern of health risks. Regarding this matter, it is necessary to mention the variety of concepts noted in the popular perception of the meaning of "food allergy", "food intolerance", "food sensitivity" and other expressions. Indeed, this is not surprising because even among doctors there is no consensus about the pertinent nomenclature. Other manifestations of food intolerance have been ascribed to the participation of IgG subclass antibodies independently of the classic allergic reaction (involving the participation of IgE antibodies). It is important to identify the population at risk and the main clinical evidence related to adverse reactions such as gastritis, migraine, arthritis, nephritis and skin alterations, since the beneficial effect of a dietary correction should not be disregarded. In this context, it is relevant the use of techniques, for identification of food antigens responsible for the adverse reactions as well as the type of antibodies involved. In a previous survey using ELISA methodology, it was shown the presence of abnormal concentrations of IgG anti-extract of Phaseolus vulgaris in 6% of blood donors, 4% of patients with auto-immune disorders, 8% of patients with other diseases and in 1 out of 7 malnourished subjects (Zanin, 2002). The aim of this review is to call the attention to the absence of Brazilian specific publications on the adverse reactions to food that are largely consumed by this population. The knowledge deficit in these areas should encourage researches in nutrition and clinical immunology.

Keywords: Food, adverse effects, humoral response, antibody, allergy

**CAMILA MARIA ZANIN¹,
JULIO SÉRGIO MARCHINI²
E IVAN FIORE DE
CARVALHO³**

¹Mestre em Alimentos e
Nutrição pela
Universidade Estadual
Paulista,

²Professor Associado e
³Professor Titular
Permissionário do
Departamento de Clínica
Médica, Faculdade de
Medicina de Ribeirão
Preto, USP.

Agradecimentos:
Fundação de Apoio ao
Ensino, Pesquisa e
Assistência do Hospital
das Clínicas da FMRPUSP
(FAEPA), Fundação
Hemocentro de Ribeirão
Preto (FUNDHERP) e a
Teresa Cristina Lopes
Guimarães.

**Endereço para
correspondência:**
Camila M. Zanin
Av. 15 de Novembro 641,
aptº 22
14801-030 Araraquara, SP
- Brasil, e-mail:
camilazanin@techs.com.br

RESUMEN

El tema de las reacciones adversas a alimentos viene siendo tratado con más frecuencia por la salud pública en consecuencia de la preocupación con los riesgos para la salud. La idea popular del significado de la "alergia alimentar", "intolerancia alimentar" y "sensibilidad", entre otras denominaciones, es muy variada. Esto no es extraño, pues aún entre médicos, no existe un consenso en la nomenclatura pertinente. Independientemente de las reacciones alérgicas clásicas (envolviendo la participación de anticuerpos de la clase IgE), otras manifestaciones de intolerancia alimentar están siendo atribuidas a la participación de anticuerpos de las subclases de IgG. Es importante conocer la población sensible y las principales manifestaciones clínicas de las reacciones adversas: gastritis, jaqueca, artritis, nefritis y alteraciones cutáneas, pues el eventual beneficio de una corrección dietética no puede ser menospreciado. En este contexto se insiere la relevancia de la aplicación de técnicas para identificar los componentes antigénicos de los alimentos responsables por las reacciones adversas bien como el tipo de anticuerpo involucrado. En un levantamiento preliminar con el empleo de la técnica de ELISA, fue demostrada la presencia de concentraciones anormales de IgG anti-extracto de Phaseolus vulgaris en 6% de donadores de sangre, 4% de pacientes con enfermedades auto inmunes, 8% de pacientes con otras enfermedades y en 1 de 7 desnutridos (Zanin, 2002). El objetivo de esta revisión es llamar la atención para la carencia de literatura específica sobre las reacciones adversas a alimentos en nuestro medio, lo que debe estimular investigaciones en las áreas de nutrición y inmunología clínica.

Palabras clave: alimentos, reacción adversa, respuesta humoral, anticuerpos, alergia

RESUMO

A questão das reações adversas a alimentos vem sendo tratada de maneira cada vez mais freqüente pela saúde pública em consequência da preocupação com riscos para a saúde. É necessário registrar a diversidade conceitual observada na percepção popular do significado de "alergia alimentar", "intolerância alimentar" e "sensibilidade", entre outras denominações. Aliás, isto não é de estranhar pois, até mesmo na classe médica, não existe um consenso na nomenclatura pertinente. Independentemente das reações alérgicas clássicas (envolvendo a participação de anticorpos da classe IgE), outras manifestações de intolerância alimentar estão sendo creditadas a participação de anticorpos das subclases de IgG. É importante reconhecer as populações de risco e as principais manifestações clínicas conseqüentes as reações adversas: gastrite, enxaqueca, artrite, nefrite e alterações cutâneas, pois o eventual efeito benéfico de uma correção dietética não pode ser desprezado. É neste contexto que insere-se a relevância da aplicação de técnicas que identificam os componentes antigênicos dos alimentos responsáveis pelas reações adversas bem como o tipo de anticorpo envolvido. Em um levantamento preliminar com o emprego da técnica de ELISA, foi demonstrada a presença de concentrações anormais de IgG anti-extrato de Phaseolus vulgaris em 6% de doadores de sangue, 4% de pacientes com doenças autoimunes, 8% de pacientes com outras doenças e em 1 de 7 desnutridos (Zanin, 2002). O objetivo desta revisão é chamar a atenção sobre a carência de literatura específica a respeito das reações adversas a alimentos em nosso meio, o que deve estimular pesquisas nas áreas de nutrição e imunologia clínicas.

Palavras-chave: alimentos, efeitos adversos, resposta humoral, anticorpos, alergia

INTRODUÇÃO

A alergia alimentar continua a ser um termo mal empregado e mal compreendido pela população em geral. Neste sentido ALTMAN e CHIARAMONTE (1996) aplicaram um questionário simples, onde abordaram a existência de alergia alimentar na população dos Estados Unidos. A pesquisa foi realizada em maio de 1989, junho de 1992 e junho de 1993 e os resultados apontaram 16 %, 17 % e 14 % daqueles que responderam, respectivamente, achavam que pelo menos um membro de sua família tinha alergia alimentar, principalmente as crianças. Essas cifras são muito diferentes da estimativa de 0,1 a 8 % de outros levantamentos com crianças, que realmente têm alergia alimentar, confirmada em estudos por desafio alimentar controlado por placebo duplo cego (SAMPSON e HO, 1997; BOCK, 1987). Um equívoco freqüente é o de que todas as reações a alimentos têm base alérgica, isto é, dependem da participação de anticorpos da classe IgE. Desta maneira até ser feito apropriadamente um diagnóstico real de alergia alimentar, recomenda-se o uso do termo **reação adversa alimentar**, de maior abrangência.

Entretanto é necessário registrar que a nomenclatura na área médica também não está estabelecida de maneira uniforme, particularmente no que diz respeito às reações adversas envolvendo alimentos*. A alergia alimentar clássica é definida como dependente exclusivamente da reação IgE (anticorpo) - alimento (antígeno) e afeta uma porcentagem pequena da população. Assim, a clássica **reação alérgica** a um nutriente ocorre rapidamente, geralmente dentro de 1 hora após estímulo. Todavia, também pode existir na reação dependente de IgE uma fase *tardia* já amplamente demonstrada em modelos de “desafio” cutâneo, nasal e bronquial, quase sempre precedidos pela reação imediata. Por outro lado, em muitos casos da assim denominada “**intolerância alimentar**” o que ocorre é uma reação adversa a alimentos incluindo reações tóxicas, farmacológicas e metabólicas. Estas podem causar alterações digestivas inespecíficas, distúrbios cutâneos e respiratórios, cujos sintomas seriam devidos à participação de anticorpos da classe IgG. A intolerância alimentar manifesta-se após horas e até mesmos dias depois da ingestão do alimento e afeta um número maior de pessoas. Portanto, deve ser considerada no diagnóstico diferencial da alergia alimentar e, embora possa ocorrer similitude de sintomas, o tratamento difere dependendo do mecanismo envolvido na reação (Wilson, 2002). A intolerância alimentar mais conhecida é a deficiência de lactase: indivíduos não toleram alimentos com lactose, pois com a falta da enzima lactase o organismo não consegue digerir este tipo de açúcar (SAMPSON, 1999). Vale registrar que atualmente, em vários países, está ocorrendo uma preocupação crescente, em termos de saúde pública, relacionada à questão de reações adversas aos alimentos (aqui considerada com a conotação mais abrangente), causada principalmente pela repercussão da extensão do problema, como por exemplo:

* Neste texto é utilizada a nomenclatura registrada nos trabalhos citados embora nem sempre o termo “alergia” corresponda à reação alérgica clássica.

- a) há estimativas indicando que 3.000.000 de norte americanos sofrem de alergia alimentar, enquanto que em outro levantamento, 5 anos mais tarde, este número alcançava 28.000.000 de pessoas (Asthma and Allergy Foundation, 1979, American College of Allergists, 1984), *apud* SLOAN e POWERS, 1986;
- b) na Inglaterra, em inquérito patrocinado pelo Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentos, 16% entre 18.582 participantes informaram possuir alergia a alimentos (YOUNG *et al.*, 1987).

Em que pese a discrepância entre as estimativas e mesmo tratando-se de outras etnias, é forçoso reconhecer que uma parcela significativa da população está sujeita aos riscos advindos das reações adversas a alimentos.

DIETA E RESPOSTA HUMORAL

A ingestão diária de alimentos e bebidas constituem a maior fonte de antígenos para o organismo humano. O risco de desenvolvimento de alergia alimentar depende da hereditariedade, exposição ao alimento, permeabilidade intestinal alterada e fatores ambientais (HAMBURGER *et al.*, 1983; Zieger *et al.*, 1989). Exposição antigênica prévia é o requisito para o desenvolvimento da alergia. Para que ocorra uma reação alérgica a um determinado alimento, proteínas ou moléculas grandes, deste alimento (antígeno/alérgeno) devem ser absorvidas, interagir com o sistema imunológico e produzir uma resposta. Sob condições normais o trato gastrointestinal e o sistema imunológico proporcionam uma barreira, a qual impede a absorção da maior parte das proteínas intactas. Barreiras não imunológicas consistem na secreção de ácido no estômago, proteólise e enzimas pancreáticas, peristaltismo e microvilosidades intestinais. Os enterócitos do intestino absorvem desde pequenos peptídios a aminoácidos, além de fragmentos não imunogênicos. A barreira imunológica utiliza IgA para proteção do lúmen intestinal e o complexo imune (CI) promove ainda a secreção de muco e proteólise na superfície da mucosa intestinal (SAMPSON, 1999). Quando esta barreira falha pode ocorrer uma sensibilização do tipo alérgica e uma reexposição ao antígeno produz a reação alérgica (Adams, 1995), similarmente ao que pode ocorrer quando a mediação é por IgG e envolver outros mecanismos. Entretanto o trato gastrointestinal pode permitir a entrada de macromoléculas (antígenos) em indivíduos normais e esses antígenos são rapidamente eliminados na circulação (WILSON e WALZER, 1935). PAGANELLI *et al.* (1979) demonstraram que proteínas alimentares podem ser absorvidas antigenicamente intactas na circulação de indivíduos normais após a ingestão do alimento ao qual são sensíveis, ocasionando a formação de CI.

A resposta humoral envolve a formação de anticorpos e possui um papel importante na patogenia das reações adversas a alimentos, pois as reações alérgicas clássicas são dependentes das imunoglobulinas IgE. A contribuição de outras classes de anticorpos na resposta imune normal para antígenos alimentares também tem sido alvo de interesse crescente há algum tempo. Assim, foi demonstrado que nível elevado de IgG aparece quando se tem um prolongado tempo de exposição ao antígeno nas membranas

mucosas (HOMBURGER *et al.*, 1986; Barnes *et al.*, 1986) e poderia representar uma resposta normal a proteína da dieta (PAGANELLI *et al.*, 1979). A diminuição da ingestão do alimento por no mínimo 3 a 6 meses pode efetivamente diminuir os níveis de anticorpos circulantes (QUINTI *et al.*, 1988).

A formação de CI representa um evento normal na resposta imune, contribuindo entre outros efeitos para a neutralização e eliminação do antígeno. A presença de níveis elevados de CI circulantes no organismo é geralmente considerada como patológica. Por outro lado, a relação da concentração de CI com o tipo de lesões encontradas, não é clara, pois níveis aumentados de CIs têm sido encontrados em várias condições clínicas; possivelmente isto se deve a diferentes propriedades biológicas relacionadas à diversidade entre os tipos de CI circulantes. Muitos tipos de CI podem ser formados na resposta para um mesmo antígeno e na evolução da mesma doença. Assim, compreende-se porque muitos testes fundamentados nas características físicoquímicas ou nas atividades biológicas dos CI, podem detectar somente uma porção limitada deles na circulação (PAGANELLI *et al.*, 1987).

Os tipos de CI formados diferem de acordo com a permeabilidade intestinal e anticorpos presentes. Assim, crianças alimentadas com leite de vaca possuem CI circulantes contendo proteínas bovinas como antígenos e IgG de origem maternal adquiridos através da placenta, confirmando a observação que o intestino do neonato é permeável a macromoléculas (DELIRE *et al.*, 1978). Baixa absorção de antígenos pela mucosa ocorre em condições normais (PAGANELLI *et al.*, 1979; PAGANELLI e LEVINSKY, 1980) e anticorpos da classe IgG, IgA e IgM reativos a β -lactoglobulina estão presentes no soro de pessoas saudáveis que incluem o leite na sua alimentação (PAGANELLI *et al.*, 1983, 1984; HUSBY *et al.* 1985).

No trabalho de PAGANELLI *et al.* (1987) foi investigada a distribuição de subclasses de IgG na resposta para β -lactoglobulina e ovoalbumina tendo sido constatado resultados similares em todos os pacientes com alergia ou intolerância alimentar com a predominância de IgG4, seguida de IgG1, IgG3 e IgG2. As subclasses de IgG reativas não estão presentes em todos o indivíduos normais, mas a resposta imune normal a alimentos, principalmente para β -lactoglobulina e ovoalbumina é igual para vários indivíduos.

Níveis de anticorpos IgA, IgG e subclasses de IgG para uma variedade de antígenos alimentares foram determinados por ELISA com predominância de IgG2 seguido de IgG1 para farinha de trigo, ao passo que IgG4 dominou a resposta para β -lactoalbumina e ovoalbumina (HVATUM, 1992). Resultados semelhantes foram relatados por Layton e STANWORTH (1984) em estudo utilizando 3 antígenos alimentares comuns: proteínas constituintes do ovo (ovoalbumina), leite (β -lactoalbumina) e trigo (glúten), confirmando a predominância da resposta por IgG4 para os 3 alérgenos.

Em adição ao conhecimento da concentração da imunoglobulina IgG, há também o interesse daí identificação da subclasse envolvida considerando a diversidade das funções biológicas de cada tipo de molécula. Exemplificando: as subclasses IgG1 e IgG3 possuem maior capacidade de ativar a via clássica do sistema complemento e ligar-se a macrófagos e outros fagócitos quando estas propriedades são comparadas com as da IgG2 e IgG4

respectivamente. Certamente as atividades efetoras das subclasses relacionam-se com os mecanismos das reações inflamatórias abrangidas nas reações adversas. Considerando que a formação de anticorpos a antígenos alimentares pode induzir reações patogênicas, esta revisão destina-se a atualizar as informações sobre a participação da resposta imunológica humoral dependente das subclasses de IgG no contexto de futuras investigações especificamente dirigidas a antígenos alimentares ainda não pesquisados, como é o caso de componentes do *Phaseolus vulgaris*, alimento largamente consumido pela população brasileira. Em trabalho anterior foi padronizada a técnica de imunoenensaio ligado a enzima (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG contra extrato de feijão tendo o levantamento preliminar constatado a presença de concentrações anormais destes anticorpos em 6% da população de saudáveis, 4% dos pacientes com doenças autoimunes, 8% dos pacientes com outras doenças e em 1 de 7 desnutridos (ZANIN, 2002). Obviamente, o desenvolvimento desta linha de pesquisa irá considerar a caracterização do(s) componente(s) antigênico(s) da leguminosa e o tipo de subclasse de IgG envolvida nas respostas humorais alteradas.

ALÉRGENOS ALIMENTARES

Muitos alimentos têm sido implicados na alergia alimentar, entretanto poucos têm sido relatados como causadores de reações adversas. Os alérgenos mais comuns são aqueles encontrados em alimentos com alto conteúdo protéico, especialmente de origem vegetal ou marinha (TAYLOR, 1986). Em crianças, os alimentos mais freqüentemente relatados como causadores de reações adversas são o leite de vaca, soja, amendoim, ovos, trigo e peixe (MARSHALL, *et al.*, 1984; BOCK, 1987; EGLESSON, 1987; SAMPSON, 1988). Entretanto, a alergia alimentar pode se desenvolver com a ingestão de qualquer alimento incluído na dieta (BOCK, 1987).

Em um levantamento de âmbito nacional nos Estados Unidos da América do Norte, os 10 alimentos mais citados como responsáveis pelos problemas foram: chocolate, leite, ovo, tomate, laranja, milho, queijo, trigo, pepino e café (SLOAN e POWERS, 1986; SAMPSON e HO, 1997). Nesta área de conhecimento não deixa de ser surpreendente, em nosso meio, a ausência de estudos sistematizados (pelo menos na literatura indexada) sobre eventuais reações adversas relacionadas aos alimentos consumidos pela população brasileira.

POPULAÇÃO DE RISCO

De uma maneira geral, a alergia alimentar é observada com maior freqüência em populações de risco como as que possuem algum tipo de desnutrição, em estados de imunodeficiências (PANUSH, 1986; ADAMS, 1995) ou em doenças do aparelho digestivo.

Pacientes desnutridos apresentam anormalidades do sistema imune e sua função alterada propiciando a instalação e o agravamento de infecções e doenças (CHANDRA, 1999). São reduzidas, as produções e as atividades de linfócitos, as respostas humoral, a imunidade celular bem como a função fagocitária; já os níveis de imunoglobulinas apresentam um leve aumento (LANGSETH, 1999; MYRVIK, 1999). Em outra situação inserem-se as

Tabela 1 Manifestações clínicas induzidas por reações adversas a alimentos

- Prurido (cutâneo, conjuntival, nasal, oral), urticária, dermatite atópica, dermatite herpetiforme-simile, angioedema, rubor, cianose, sudorese, bolhas, formigamento na boca e garganta, edema labial, gosto metálico.
- Conjuntivite, lacrimejamento.
- Espirros, congestão nasal, rinorréia, rouquidão, estridor, edema laringeal, dispnéia, taquipnéia, broncorréia, chiado, asma.
- Hipotensão, taquicardia, arritmia.
- Náuseas, vômitos, câibras, dor abdominal, distensão, diarreia, constipação, esteatorréia, colite hemorrágica (lactentes), gastroenterocolite eosinofílica, enteropatia (glúten-sensível, proteína-dietética), incontinência fecal e urinária.
- Artralgia, artrite.
- Cefaléia, enxaqueca.

doenças auto-imunes: apresentam uma produção anormal de anticorpos (auto-anticorpos) e uma atividade alterada de células T (células T auto-reativas). Hipoteticamente, estas alterações do sistema imunológico poderiam predispor a uma resposta anômala frente a antígenos alimentares usuais. São exemplos de doenças auto-imunes o lúpus eritematoso sistêmico (LES), a artrite reumatóide (AR), e a esclerose múltipla (ES), entre outras.

Clinicamente chama atenção a alta frequência de artrite entre as doenças reumáticas auto-imunes. Na realidade, existem evidências circunstanciais que relacionam a artrite à função intestinal alterada: na colite ulcerativa (WRIGHT e WATKINSON, 1965), na doença de Crohn (VAN PATTER, 1954) e na cirurgia de desvio jejunal para o tratamento da obesidade mórbida (WANDS *et al.*, 1976). Ainda nesta linha de comentários é necessário destacar uma investigação recente sobre o efeito benéfico da aplicação de uma dieta vegetariana livre de glúten a pacientes com artrite reumatóide. Os autores verificaram uma significativa melhora clínica em 40,5 % dos pacientes após nove meses de adesão a dieta, acompanhada por uma redução da concentração sérica de IgG anti-gliadina e β -lactoglobulina (HAFSTROM *et al.*, 2001). Portanto, a hipótese de benefícios conseqüentes à aplicação de uma dieta corretiva, não deve ser subestimada.

SINTOMATOLOGIA

O constante aumento da frequência de doenças relacionadas com reações alérgicas a alimentos representam um sério desafio para imunologistas e alergistas (PAGANELLI *et al.*, 1987). Pacientes com sintomatologia variada como gastrite, enxaqueca, artrites e nefrites constituem a população de interesse para a investigação de eventual patologia alérgica (BROSTOFF e CHALLACOMBE, 1982; WOUDE *et al.*, 1983). Os sintomas podem estar “mascarados” simulando o quadro clínico de outras doenças, pois estas reações

(dependentes da resposta do sistema imunológico) são de natureza inflamatória. Assim, fica claro que as reações adversas aos alimentos podem provocar um amplo leque de manifestações clínicas mediadas por IgE (alergia clássica) ou por IgG.

Portanto, não deixa de causar surpresa a abrangência do espectro das manifestações clínicas associadas aos mecanismos imunológicos das reações adversas a alimentos, as mais freqüentemente relacionadas na literatura estão na Tabela 1.

Ainda que a relação entre algumas das manifestações assinaladas e reação adversa seja alvo de controvérsias, a intolerância alimentar representa um importante problema de saúde, impondo-se a necessidade de pesquisas clínicas sobre os antígenos alimentares, a classe e a subclasse dos anticorpos envolvidos nas reações adversas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante estar atento aos sintomas suspeitos de relação com a intolerância alimentar, pois o tratamento pode resumir-se a uma simples modificação da dieta. A alimentação é fundamental para manutenção da higidez como também para a terapêutica e prevenção de muitas doenças, mas certos alimentos ou aditivos alimentares podem se tornar nocivos às pessoas sensíveis aos mesmos. Portanto é essencial estar alerta à sintomatologia imediata ou retardada após a ingestão alimentar para caracterizar o tipo de reação e determinar com precisão o alimento envolvido. Isto é válido principalmente para a ingestão de alimentos como o leite, trigo, ovos, frutos do mar e, também, para aditivos de preservação ou coloração de produtos alimentares. Neste contexto, não pode deixar de ser considerada a relevância da aplicação de métodos que determinem com precisão qual o alimento associado às manifestações adversas dependentes de mecanismos imunológicos. Assim, a decisão de indicar correção dietética irá não só contribuir para melhorar a qualidade de vida do paciente como, certamente, no contexto da saúde pública, proporcionar diminuição dos custos sociais envolvidos no atendimento de condições crônicas suspeitas de relação com as reações adversas a alimentos.

Finalmente, chama atenção a carência de pesquisa sobre as reações adversas a alimentos na etnia brasileira e acreditamos que seria de interesse promover estudos sobre este tema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCE

- ADAMS, E.J. Cuidado nutricional na alergia e intolerância alimentar. In: MAHAN, L.K.; ARLIN, M.T. *Krause alimentos nutrição e dietoterapia*. 8.ed. São Paulo: Rocca, 1995. cap.38, p.695-713.
- ALTMAN, D.; CHIARAMONTE, L. Public perception of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.97, p.1247-1251, 1996.
- BARNES, R.M.; HARVEY, M.M.; BLEARS, J.; FINN, R.; JOHNSON, P.M. IgG subclass of human serum antibodies reactive with dietary proteins. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* v.81, p.141-147, 1986.
- BOCK, S.A. Prospective appraisal of complains of adverse to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics.* v.79, p.683-688, 1987.

- BROSTOFF, J.; CHALLACOMBE, S.J. Food allergy. In: *Clinics in immunology and allergy*. London.1982. v.2.
- CHANDRA, R.K. Nutrition and immunology: from the clinic to celular biology and back again. *Proc. Nutr. Soc.* v.58, p.618-623, 1999.
- DELIRE, M. CAMBIASO, C.L.; MASSON, P.L. Circulating immune complexes in infants fed on cow's milk. *Nature*. v.272, p.632, 1978.
- EGLESSON, P.A. Prospective studies in the natural history of food allergy. *Ann. Allergy*. v.54, p.179-182, 1987.
- HAFSTROM, I.; RINGERTZ, B.; SPANBERG, A.; ZWEIGBERGK, L.; BRANNEMARK, S.; NYLANDER, I.; RONNELID, J.; LAASONEN, L.; KLARESKOG, L. A vegan diet free of gluten improves the signs and symptoms of rheumatoid arthritis: the effects on arthritis correlate with a reduction in antibodies to food antigens. *Rheumatology*. v.40, p.1175-1179, 2001.
- HAMBURGUER, R. N.; HELLER, S.; MELLON, M.H.; O'CONNOR, R.D.; ZIEGER, R.S. Current status of the clinical and immunologic consequences of a prototype allergic disease prevention program. *Ann. Allergy*. v.51, p.281-290, 1983.
- HOMBURGUER, H.; MAUER, K.; SACHS, M.I.; O'CONNEL, E.J.; JACOB, G.L.; CARON, J. Serum IgG4 concentrations and allergen-specific IgG4 antibodies compared in adults and children with asthma and nonallergic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.77, p.427-434, 1986.
- HUSBY, S.; JENSENIUS, J.C.; SVEHAG, S.E. ELISA quantitation of IgG subclass antibodies to dietary antigens. *J. Immunol. Methods*. v.82, p.321-331, 1985.
- HVATUM, M.; SCOTT, H.; BRANDTZAEG, P. Serum IgG subclass antibodies to a variety of antigens in patients with coelic disease. *Gut*. v.33, p.632-638, 1992.
- LANGSETH, L. Nutrition and Immunity in man. *International Life Sciences Institute Europe*. Bélgica: Concise Monograph Series, 1999, p.21-26.
- LAYTON, G.T.; STANWORTH, D.R. The quantitation of IgG₄ antibodies to three common food allergens by ELISA with monoclonal anti-IgG₄. *J. Immunol. Methods*. v.26, p.347-356, 1984.
- MARSHALL, S.G.; BIERMAN, C.W.; SHAPIRO, G.G. Otitis media with effusion in childhood. *Ann. Allergy*. v.53, p.370-378, 1984.
- MYRVIK, Q.N. Nutrition and immunology. In: SHILLS M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. *Modern nutrition health and disease*. 9th.ed. Philadelphia: Willians & Wilkins, 1999. cap.32, p.585-613.
- PAGANELLI, R.; ATHERTON, D.J.; LEVINSKY, R.J. Differences between normal and milk allergic subjects in their immune responses after milk ingestion. *Arch. Dis. Child.* v.58, p.201-206, 1983.
- PAGANELLI, R.; LEVINSKY, R.J. Solid phase radioimmunoassay for detection of circulation food protein antigens in human serum. *J. Immunol. Methods*. v.37, p.333-41, 1980.
- PAGANELLI, R.; LEVINSKI, R.J.; BROSTOFF, J.; WRAITH, D.G. Immune complexes containing food proteins in normal and atopic subjects after oral challenge and effect of sodium cromoglicate on antigen absorption. *Lancet*. v.1, p.1270-1272, 1979.
- PAGANELLI, R.; MATRICARDI, P.M.; AIUTI, F. Interactins of food antigens, antibodies and antigen-antibody complex in health and disease. *Clin. Rev. Allergy*. v.2, p.69-78, 1984.
- PAGANELLI, R.; QUINTI, I.; D'OFFIZI, G.P.; PAPPETTI, C.; CARINI, C.; AIUTI, F. Immune complexes in food allergy: a critical reappraisal. *Ann. Allergy*. v.59, p.157-61, 1987.
- PANUSH, R.S. Possible role of food sensitivity in arthritis. *Ann. Allergy*. v.61, p.31-35, 1988.
- QUINTI, I.; PAPPETTI, C.; D'OFFIZI, G.; CAVAGNI, G.; PANCHOR, M.L.; LUNARDI, C.; PAGANELLI, R. IgG subclasses to food antigens. *Allerg Immunol*. v.20, p.41-43, 1988.

- SAMPSON, H.A. Food allergy. In: SHILLS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. *Modern nutrition health and disease*. 9th.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1999. cap.77, p.1391-1398.
- SAMPSON, H.A. Immunologically-mediated food allergy: the importance of food challenge procedures. *Ann. Allergy*. v.60, p.262-269, 1988.
- SAMPSON, H.A.; HO, D.G. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.100, p.444-451, 1997.
- SLOAN, A.E.; POWERS, M.E. A perspective on popular perceptions of adverse reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.78, p.127-133, 1986.
- TAYLOR, S.L. Food allergies and sensitivities. *J. Am. Diet Assoc.* v.86, p.599-600, 1986.
- VAN DER WOUDE, F.J.; HOEDEMAEKER, P.J.; VAN DER GIESSEN, M.; DE GRAEFF, P.A.; DE MONCHY, J.; THE, T.H.; VAN DER HEM, G.K. Do food antigens play a role in the pathogenesis of some cases of human glomerulonephritis? *Clin. Exp. Immunol.* v.51, p.587-594, 1983.
- VAN PATTEN, W.N.; BARGEN, J.A.; DOCKERTY, M.B.; FELDMAN, W.H.; MAYO, C.W.; WAUGH, J.H. Regional Enteritis. *Gastroenterology*. v. 26, p.347-450, 1954.
- WANDS, J.R.; LAMONT, J.T.; MANN, E.; ISSELBACHER, K.J. Arthritis associated with intestinal by-pass procedure for morbid obesity. Complement activation and character of circulating cryoproteins. *N. Engl. J. Med.* v.294, p.121-124, 1976.
- WILSON, S. H. Terapia clínica nutricional para alergia e intolerância alimentar. In: MAHAN, L.K.; SCOTT-STUMP, S. *Krause alimentos nutrição e dietoterapia*. 10.ed. São Paulo: Rocca, 2002. cap.41, p.882-903.
- WILSON, S. J.; WALZER, M. Absorption of undigested proteins in human blings; absorption of renaltered egg protein in infants and in children. *Am. J. Dis. Child.* v.50, p.49-54, 1935.
- WRIGHT, V.; WATKINSON, G. The arthritis of ulcerative colitis. *Br. Med. J.* v.2, p.670-675, 1965.
- YOUNG, E.; PATEL, S.; STONE, H.A.M.; RONA, R.; WILKINSON, J.P. The prevalence of reaction too food additives in a survey population. *J. R. Coll. Physicians Lond.* v.21, p.241-247, 1987.
- ZANIN, C.M. Padronização do método de imunoensaio ligado a enzima (ELISA) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-antígenos do *Phaseolus vulgaris*. Araraquara, SP., 2002. p.1-74. Dissertação. Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP Campus de Araraquara.
- ZIEGER, R.S.; HELLER, S.; MELLON, M.H.; FORSYTHE, A.B.; O'CONNOR, R.D.; HAMBURGUER, R.N.; SCHATZ, M. Effect of combined maternal and infant food-allergen avoidance on development of atopy in early infancy a randomized study. *J Allergy Clin. Immunol.* v.84, p.72-89, 1989.

Recebido para publicação em 01/10/02. Aprovado em 06/12/02.

As múltiplas funções das lectinas vegetais

The multiple functions of plant lectins

ABSTRACT

POVINELI, K.L.; FINARDI FILHO, F., The multiple functions of plant lectins. *Nutrire; rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP, , v.24, p.135-156, dez., 2002

This paper focuses on the biochemical and molecular features of plant lectins as well as the their functional and biotechnological application, by means of the understanding of specific lectin-carbohydrate interactions. The current knowledge about plant lectins helps to understand the physiological role, the plant's self-protection mechanisms, and its toxic action on predators, as well as permitting the development of diagnostic techniques and the design of new quimeric genes to be expressed on modified plants.

Keywords: lectins, plant proteins, protein-carbohydrate interaction, molecular structure

**KAREN LENTINI
POVINELI' E FLAVIO
FINARDI FILHO²**

^{1,2} Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

Endereço para correspondência:

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – 05508-900 São Paulo SP, Brasil

Agradecimentos:

À FAPESP pelo apoio financeiro processo nº 95/03862-3. À CAPES pela bolsa de mestrado. À Kílvia Craveiro e Renato A. Moreira do Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Ceará

RESUMEN

El texto se dedica al estudio de algunos aspectos bioquímicos y funcionales de las lectinas vegetales. Trata en especial de la caracterización molecular y de la aplicación biotecnológica de tales proteínas, a través del conocimiento de la especificidad de las interacciones proteína-carbohidrato. El conocimiento actual contribuye a aclarar el carácter fisiológico de las lectinas, los mecanismos internos de protección de la planta y la acción tóxica sobre los predadores. De igual manera, tal conocimiento permite el desarrollo de técnicas de diagnóstico y abre la posibilidad de que se proyecten formas nuevas de expresión en las plantas genéticamente modificadas.

Palabras-clave: lectinas, proteínas vegetales, interacción proteína-carbohidrato, estructura molecular

RESUMO

O trabalho aborda aspectos bioquímicos e funcionais das lectinas vegetais com ênfase na caracterização molecular e na aplicação biotecnológica dessas proteínas, através do conhecimento da especificidade das interações proteína-carbohidrato. O conhecimento atual ajuda a esclarecer o papel fisiológico das lectinas, os mecanismos internos de proteção da planta e a ação tóxica sobre predadores, bem como permite o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e possibilita o delineamento de novas formas de expressão em plantas geneticamente modificadas.

Palavras-chave: lectinas, proteínas vegetais, interação proteína-carbohidrato, estrutura molecular

INTRODUÇÃO

As lectinas constituem um grupo de proteínas presentes em organismos vivos distintos, sobretudo em vegetais. Por serem proteínas com altas taxas de expressão em plantas e que se caracterizam pela ação sobre outros organismos vivos, as lectinas continuam sendo estudadas, ganhando grande importância científica e prática em diversos campos do conhecimento em pouco mais de um século após seu descobrimento. Uma importante revisão histórica foi publicada por SHARON e LIS (1987).

Inicialmente identificadas como proteínas tóxicas, as lectinas tornaram-se ferramentas indispensáveis em diagnósticos de doenças, de tipagem sanguínea e de identificação de cepas de microrganismos. Elas têm dado suporte a estudos moleculares, estruturais, genéticos e de fisiologia vegetal entre outros, através do detalhamento das interações proteína-proteína e proteína-carboidrato. No entanto, as reações adversas causadas por lectinas continuam sendo uma linha de investigação acadêmica em vegetais empregados como alimentos, seja entre os convencionais, ou entre os novos produtos, identificados em plantas consideradas exóticas ou recém domesticadas.

Este trabalho apresenta a resenha de uma parcela do conhecimento acumulado sobre as lectinas de vegetais e suas diversas funções, desde as evidências de ação tóxica, passando pelo papel desempenhado na tipagem e caracterização celular, até atingir as mais recentes descobertas como participantes de mecanismos de transdução de sinal e a transferência de genes para outras culturas com a finalidade de aumentar o potencial de resistência ao ataque de insetos.

CONCEITUAÇÃO

O conceito atualmente mais aceito para a definição de lectinas coloca-as como proteínas ligantes de carboidratos, de origem não imune, aglutinantes de células e glicocojugados, com capacidade de reconhecimentos específicos e de manter ligações reversíveis com carboidratos e substâncias contendo açúcares, sem alterar a estrutura covalente de alguns ligantes glicosílicos (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

Esta definição, porém, exclui algumas proteínas que apresentam homologia estrutural e capacidade de ligação a carboidratos de modo semelhante à ligação das lectinas, mas de característica monovalente. Assim, essas proteínas possuem apenas um sítio para a ligação com açúcar e, portanto, não têm capacidade aglutinante, como por exemplo, as toxinas ricina e abrina (MOREIRA *et al.*, 1991).

De acordo com a nova definição, todas as proteínas de plantas que possuem no mínimo um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos são consideradas lectinas (SHARON e LIS, 1990). Assim, foi possível incluir um número grande de proteínas com diferentes capacidades de aglutinação e com propriedades de precipitar glicocojugados, levando seus autores a subdividirem as lectinas em três classes:

I. As merolectinas são proteínas contendo exclusivamente um único domínio ligante a carboidratos. São proteínas polipeptídicas simples, que devido a sua estrutura monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Exemplos bem conhecidos deste grupo são as heveínas, lectinas de *Hevea brasiliensis* (PARIJS *et al.*, 1991) e as proteínas ligantes monoméricas de orquídeas (PEUMANS e VAN DAMME, 1995).

II. As hololectinas também são formadas por um único domínio ligante a carboidratos, mas contêm dois ou mais desses domínios que podem ser idênticos ou muito homólogos. Este grupo compreende todas as lectinas que têm múltiplos sítios de ligação e, em função dessas características, são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Obviamente a maioria das lectinas de plantas conhecidas são hololectinas, por isso comportam-se como hemaglutininas.

III. As quimerolectinas são proteínas que, além do domínio ligante a carboidrato, possuem um outro domínio não relacionado com este. O segundo domínio pode ter uma atividade catalítica ou uma outra atividade biológica bem definida agindo independentemente do domínio de ligantes de carboidratos. Em função do número de sítios de ligações a açúcares, as quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). As RIPs tipo II, sigla das proteínas inativadoras de ribossomos, e as quitinases tipo I de plantas, exemplificam respectivamente os dois casos citados.

OCORRÊNCIA E NOMENCLATURA

As lectinas estão distribuídas amplamente na natureza, sendo encontradas em todas as classes e famílias dos organismos vivos, desde microorganismos, até animais vertebrados e invertebrados e plantas (SHARON e LIS, 1989).

Entre as plantas, as lectinas têm sido relatadas e purificadas de folhas, frutos, raízes, tubérculos, rizomas (PEUMANS *et al.*, 1985), bulbos, cascas, caules (VAN DAMME *et al.*, 1987) e predominantemente de sementes de muitas plantas (BOLINI e CHRISPPEELS, 1978; WANG e NG, 1998), onde elas constituem até 10% do conteúdo total de proteínas de extratos de sementes maduras (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). A maioria das lectinas de sementes maduras de leguminosas está localizada nos cotilédones que funcionam como reserva de nutrientes, usados durante sua germinação.

Com relação à nomenclatura não existe uma padronização sistemática adotada para as lectinas, resultando no uso de critérios mistos e distintos. Por exemplo, as designações similares à denominação científica ou ao nome vulgar das espécies das quais elas foram purificadas são muito freqüentes. Apesar de essas denominações terem caráter histórico, algumas novas lectinas tiveram seus nomes escolhidos seguindo essa tendência, conforme mostra a Quadro 1.

ESPECIFICIDADES E FUNÇÕES

A especificidade das lectinas é usualmente estabelecida pelo ensaio de inibição de haptenos em que diferentes carboidratos são testados em sua habilidade em inibir a

Quadro 1 Denominação de algumas lectinas

Lectina	Espécie	Nome Vulgar	Relatado por *
Abrina	<i>Abrus precatorius</i>	jequiriti	Erlich, 1881
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	feijão-de-porco	Somner e Howell, 1936
Crotina	<i>Croton tiglium</i>	—	Stillmark, 1888
Favina	<i>Vicia faba</i>	fava	Boyd e Reguera, 1949
Frutalina	<i>Arthocarpus incisa</i>	fruta-pão	Moreira <i>et al.</i> , 1998
Heveina	<i>Hevea brasiliensis</i>	seringueira	Van Parijs <i>et al.</i> , 1991
Jacalina	<i>Arthocarpus integrifolia</i>	jaca	Young <i>et al.</i> , 1989
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	feijão comum	Nowel, 1960
Ricina	<i>Ricinus communis</i>	mamona	Stillmark, 1888

* Segundo SHARON e LIS, 1987

hemaglutinação ou a precipitação de polissacarídeos ou glicoconjugados pela lectina. A especificidade de uma lectina é definida em termos dos monossacarídeos que melhor inibem a reação de aglutinação (RAY *et al.*, 1992). Apesar da baixa precisão, trata-se da mais simples e usada técnica. De acordo com a especificidade as lectinas foram classificadas em quatro grupos, conforme a configuração relativa dos carboidratos 3 e 4 (C₃ e C₄) do anel piranosídico dos monossacarídeos inibidores. Grupo I: L-fucose; Grupo II: galactose/N-acetil-galactosamina; Grupo III: glicose/manose; Grupo IV: idose, gulose, L-glicose e L-xilose.

Deve-se ressaltar que até o momento nenhuma lectina isolada se mostrou inibida por açúcares pertencentes ao grupo IV. Por outro lado, o isolamento de lectinas que se mostravam fortemente inibida por N-acetilglicosamina e ácido-N-acetilneuramínico levaram à inclusão desses açúcares em dois grupos complementares (MOREIRA *et al.*, 1991).

Apesar de muitas investigações, o papel fisiológico das lectinas ainda não está bem estabelecido (VOZARI-HAMPE *et al.*, 1992). Sua localização e seu comportamento durante o ciclo de vida da planta são de extrema importância para evolução de algumas hipóteses sobre suas funções. Entre os mais destacados, está o de reconhecimento celular, que se manifesta de maneira distinta em diferentes órgãos e tecidos do mesmo organismo.

Outras funções são atribuídas às lectinas como, transporte e armazenamento de carboidratos e sua fixação na planta, alongação da parede celular e regulação de crescimento, reconhecimento dos receptores de membrana, mitose induzida na formação celular e protoplasto, morfogênese embrionária, fagocitose e proteção celular, exercendo função enzimática ou como proteína de reserva (KNOX *et al.*, 1976), e como mediadoras da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e raízes de leguminosas (BOHLOOL e SCHMIDT, 1974). E por fim, participando da proteção de plantas contra patógenos e predadores (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991).

A simbiose que ocorre entre leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium* é de alta especificidade, através da adesão das bactérias às raízes. O mecanismo de indução à fixação de nitrogênio nos nódulos em raízes de leguminosas, nas bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, é hospedeiro-específico da planta. Esta especificidade é expressa nos estágios iniciais do processo de infecção, envolvendo múltiplas interações entre mediadores da bactéria e da planta. Dentre os mediadores do vegetal, sugere-se que as lectinas de raízes reconheçam moléculas receptoras em bactérias, determinando a especificidade pelo hospedeiro.

Esta hipótese tornou-se bastante evidente pelo trabalho de DIAZ *et al.* (1989), que utilizaram técnicas de recombinação gênica, introduzindo em trevo branco (*Trifolium repens L.*) o gene que codifica a lectina de ervilha (*Pisum sativum*). As plantas transgênicas obtidas foram noduladas pela bactéria *Rhizobium leguminosarum*, que antes nodulava especificamente a ervilha. Os resultados mostraram que a interação *Leguminosae-Rhizobium* é, pelo menos parcialmente, determinada por interações raiz-lectina.

Sugestivas evidências para um papel da lectina têm surgido da interação lectina-fungo. MIRELMAN *et al.* (1975), mostraram que a lectina de germe de trigo liga-se a hifas de *Trichoderma viride*, um fungo que contém quitina e glicanos na parede das hifas. A lectina inibiu o crescimento e a germinação dos esporos do fungo, aparentemente interferindo na síntese de quitina da parede. A heveína, uma proteína com características de lectina, encontrada em látex de seringueira, *Hevea brasiliensis*, interagiu com moléculas precursoras de quitina impedindo a formação e a renovação da quitina das paredes das hifas (PARIJS *et al.*, 1991).

A metabolização mais tardia de algumas lectinas e a inibição do crescimento de fungos patógenos por outras sugere um papel de proteção, durante os primeiros estágios de desenvolvimento da planta, como a embebição, a semeadura e a germinação inicial das sementes (MIRELMAN *et al.*, 1975).

No caso da lectina de germe de trigo (WGA), esta hipótese torna-se mais evidente pelo fato de a lectina estar localizada na superfície de células mais susceptíveis à infecção (MISHKIND *et al.*, 1982). As altas concentrações de lectinas em muitas sementes e as evidências de que apreciáveis quantidades de lectinas são exudadas de sementes para o meio externo, durante a germinação, também reforça esta hipótese. Resultados similares foram comprovados por KJEMTRUP *et al.* (1995) em células germinativas de raízes do feijoeiro, nas quais apenas a forma PHA-E é sintetizada e pode ser encontrada no meio, junto às raízes. Os autores não constataram a presença de mRNA da forma PHA-L, como ocorre nos cotilédones.

GIBSON *et al.* (1982) encontraram níveis mais altos de lectinas presentes em sementes de cultivares de soja resistentes ao ataque pelo fungo *Phytophthora megasperma* var. *sojae* do que em sementes de cultivares susceptíveis e que a lectina era exudada das sementes para a água de embebição, rapidamente e em grandes quantidades, do que naqueles cultivares resistentes.

Outro papel importante das lectinas está ligado aos mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de insetos que se atribui principalmente às lectinas que se ligam à quitina, um polissacarídeo de N-acetilglicosamina, que constitui um elemento estrutural importante na parede celular de muitos fungos fitopatogênicos, do exoesqueleto e do trato digestivo dos insetos e da cutícula de nematóides (LERNER e RAIKHEL, 1992). As células epiteliais ao longo do trato digestivo de insetos fitofágicos são diretamente expostas ao conteúdo da dieta, por essa razão são possíveis alvos para proteínas de defesa de plantas. As glicoproteínas são as maiores constituintes destas membranas que podem ser sítios de ligação das lectinas. A formação do complexo provoca no local um efeito deletério, ou sistêmico; em consequência o inseto pode ser repellido, pode ter seu crescimento retardado ou não atingir a fase adulta (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Assim, tais lectinas caracterizam-se como verdadeiros compostos biostáticos ou biocidas para tais insetos, nas concentrações em que são presentes nas plantas.

FATORES QUE INFLUENCIAM A ATIVIDADE

Muitos são os fatores que influenciam a atividade das lectinas, tais como íons, pH e tratamentos térmicos. Com algumas poucas exceções, todas as lectinas necessitam de íons para sua atividade. Assim, lectinas de leguminosas contêm Mn^{2+} e Ca^{2+} , elementos essenciais para sua atividade. Por exemplo, o tratamento de concanavalina A, Con A, em meio ácido remove essencialmente os íons metálicos, destruindo sua capacidade de se ligar a carboidratos. A forma ativa pode ser retomada adicionando-se os íons em uma ordem estabelecida: primeiro Mn^{2+} e depois o Ca^{2+} (SHARON e LIS, 1990).

Os metais conferem um alto grau de estabilidade estrutural à Con A, protegendo as lectinas contra a inativação pelo calor (DOYLE *et al.*, 1975). A presença de Ni^{2+} , isoladamente de outros metais no meio, protege a Con A contra proteólises em pH 7,0, mas não em pH 8,2. Adicionalmente, o fator pH pode ser de grande importância sobre a atividade de lectinas. O aumento do pH de 2,0 para 7,0 resulta em diminuição da capacidade de aglutinar hemáceas, conhecida por atividade hemaglutinante ou AH, de lectina de sementes de *Ficus cunia*, torna-se nula em pH 8,0 e pode ser restabelecida pela diminuição gradativa do pH até 2,0 (RAY *et al.*, 1992).

A estabilidade térmica das lectinas é bastante variável. Lectinas de diversas fontes mostraram-se estáveis após serem mantidas congeladas por meses ou anos, após sucessivos congelamentos e descongelamentos (CORREIA e COELHO, 1995) ou mantidas por poucos dias em temperatura ambiente (RAY *et al.*, 1992). A estabilidade de lectinas isomórficas é em geral coerente entre os componentes de uma mesma espécie. Pode-se citar o exemplo das lectinas de *R. communis*, RCA I e RCA II que apresentam estabilidade térmica e mudanças de atividade em função do pH, bastante similares. Ambas, perdem 50% da atividade a 65°C e são totalmente inativadas a 85°C por 3 horas e, em condições normais, mantêm suas atividades entre pH 3,0 e 9,0 (NICOLSON *et al.*, 1974).

São ainda exemplos de comportamento similar as isolectinas I e II do pinhão,

semente do pinheiro *Araucaria brasiliensis*. Ambas sofrem mudanças de atividade pela ação de EDTA, porém a AH é aumentada com adição de Ca^{2+} e Mn^{2+} . Além disso, elas mantêm suas AH estáveis nas faixas de pH 5,5 a 7,5, para I e 6,5 a 7,5 para II, e são inativadas em pH 10,5. A estabilidade térmica das duas lectinas também é semelhante, pois as AHs são mantidas quando tratadas a 30°C, por 30 min, e totalmente perdidas a 80°C (DATTA *et al.*, 1991).

Os casos de isomorfismo com atividades e parâmetros de estabilidade semelhantes indicam pequenas diferenças moleculares entre as formas, podendo ser fruto de transformações pós-tradução, como proteólise ou glicosilação diferenciada, e de duplicidade de genes, durante os processos de cruzamento e melhoramento genético de variedades comerciais.

A estrutura das lectinas tem destacado papel regulador nas atividades hemaglutinantes e citotóxicas (LORIS *et al.*, 1998). Em trabalhos que promoveram mutagênese das cadeias protéicas de lectinas foi possível constatar a participação de resíduos de aminoácidos localizados em alças laterais de domínios específicos. Por exemplo, mutações dirigidas em ricina puderam comprovar que coexistem três sítios de ligação de galactose em subdomínio da cadeia B (FRANKEL *et al.*, 1996). Sob essas condições de alteração molecular nos subdomínios 1 α , 1 β e 2 γ há redução da citotoxicidade da subunidade RTB, enquanto a RTA não é afetada.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

Como as lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas são também múltiplas as formas e as propriedades moleculares encontradas em plantas distintas. A começar pela massa molecular que pode variar de 3,5 KDa para a *Crotalaria striata* (SIKDAR *et al.*, 1990) até 480 KDa para *Aegopodium podagraria* (PEUMANS *et al.*, 1985). Algumas lectinas são muito distintas em sua estrutura, composição de aminoácidos, tamanho e volume da molécula, e conteúdo de íons e de carboidratos.

De maneira geral as lectinas vegetais são compostas por subunidades, idênticas ou não, que variam de dois a quatro monômeros por moléculas, sendo raras as formas monoméricas, como é o caso da lectina da batata. Algumas lectinas são diméricas, como a do germe de trigo (WGA) com duas subunidades idênticas e peso molecular de 21,6 KDa e a ricina, com duas subunidades distintas e peso molecular de 63 KDa. A mais comum, no entanto, é a forma tetramérica, como das lectina de *Canavalia ensiformis* e de *Dioclea grandiflora*, ambas com 4 subunidades idênticas.

A Con A é um tetrâmero composto por uma mistura de subunidades de cadeia polipeptídica única, com 237 resíduos, e de subunidades fragmentadas em duas cadeias complementares e idênticas à anterior, com uma falha na ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119 (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Apesar de não estarem ligados covalentemente, os dois fragmentos, denominados beta e gama, são mantidos juntos por ligações não covalentes e formam um protômero cuja estrutura tridimensional é essencialmente a mesma da

subunidade formada pela cadeia polipeptídica íntegra (SHARON e LIS, 1989).

A dissociação entre estas subunidades pode ser irreversível, na presença de detergentes como SDS, ou reversíveis, na presença de cloridrato de guanidina, como nos casos de PHA e WGA, e além disso, modificações químicas também podem afetar a estrutura da subunidade e, em decorrência, a conformação protéica. Deve-se destacar que os padrões de associação entre as subunidades podem variar de acordo com o pH em que elas se encontrem. Entre pH 5,0 e 8,0 a lectina de *Dioclea grandiflora* apresenta-se como um tetrâmero com massa molecular aparente de 100 KDa. Em pH inferior, a lectina é encontrada na forma de dímero e em valores de pH acima de 8,0, ela forma agregados (MOREIRA *et al.*, 1985).

As lectinas de leguminosas podem ser encontradas em diferentes formas moleculares. Em *Phaseolus vulgaris*, a PHA é formada por dois tipos de subunidades, denominadas E (31,7 KDa) e L (29,9 KDa), produtos de genes distintos. Estas duas subunidades se associam em várias proporções, dando origem a uma família de cinco isolectinas: E₄, L₁E₃, L₂E₂, L₃E₁ e L₄. Vale destacar que a forma E₄ é uma potente eritroaglutinina e a L₄ possui forte ação mitogênica, enquanto as formas intermediárias apresentam ambas as propriedades em graus diferenciados (SHARON e LIS, 1989). Os dois tipos de subunidades, E e L, que constituem as isolectinas da PHA diferem em suas composições nos resíduos amino-terminais e nos pontos isoeletrônicos.

Algumas lectinas apresentam outra característica, que parece ser comum àquelas de plantas pertencentes à sub-tribo *Diocleinae*, de possuírem algumas subunidades quebradas em fragmentos. O principal ponto de clivagem, tanto na lectina de *Canavalia ensiformis* (WANG *et al.*, 1971), como na lectina de *Dioclea grandiflora* (AINOUZ *et al.*, 1987), duas lectinas desta sub-tribo que apresentam elevado grau de homologia, é entre os aminoácidos Asn (118) e Ser (119), produzindo duas subunidades quase simétricas na cadeia de 237 aminoácidos. Outras lectinas da mesma família apresentam perfis semelhantes, evidenciados por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β-mercaptoetanol, como nos casos das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea sclerocarpa* (MOREIRA *et al.*, 1985) e *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991).

Formas moleculares múltiplas de lectinas, resultantes de mobilidades eletroforéticas distintas, são atribuídas a pequenas modificações da estrutura primária, como diferenças nas cadeias laterais e nos carboidratos de glicolectinas. Podem ser formadas anteriormente ou durante o isolamento da lectina; como um resultado das modificações nas cadeias, assim como hidrólise do grupo amida, de glutamina ou asparagina, das proteínas (SHARON e LIS, 1989). Se a heterogeneidade da origem genética não foi definida, o termo isoforma pode ser próprio para formas moleculares de lectinas presentes em uma mesma espécie (PAIVA e COELHO, 1992).

Como visto, não existem aspectos estruturais comuns para todas as lectinas. As lectinas de vegetais superiores são ricas em aminoácidos ácidos, Asp e Glu, e hidroxilados, Ser e Thr, os quais em conjunto podem representar até mais de 30% do conteúdo de aminoácidos e são pobres ou destituídos de aminoácidos sulfurados, com poucas

exceções como as lectinas de germe de trigo e de batata que são ricas em cisteína com 20,0% e 11,5% dos resíduos, respectivamente. A maioria das lectinas, são glicoproteínas, com teores de açúcares variando muito e em alguns casos chegando a 50%, como é o caso da lectina da batata *Solanum tuberosum* (SHARON e LIS, 1989).

Na Con A, uma das mais estudadas com relação a sua dependência por metais, a associação dos íons à estrutura protéica tridimensional ocorre em etapas. Primeiro, o íon Mn^{2+} se liga a um sítio para metais denominado S1, induzindo a formação de um segundo sítio S2, onde o íon Ca^{2+} será ligado. A ocupação dos sítios metálicos por estes íons de alguma maneira modifica a estrutura da proteína, de forma a conferir à mesma o reconhecimento ao carboidrato ao qual a lectina tem afinidade (SHARON e LIS, 1990).

O sítio S1 é formado pelos resíduos Glu 8, Asp 10, Asp 19, His 24 e duas moléculas de água. Os resíduos Val 32 e Ser 34 estão envolvidos de forma indireta na ligação dos íons Mn^{2+} . Cada um destes resíduos estabelece uma ponte de hidrogênio com uma das duas moléculas de água que estão interagindo diretamente com o íon. O sítio S2 é formado pelos resíduos Asp 10, Asn 19, Tyr 12 e duas moléculas de água, diferentes das moléculas de água do sítio S1. Os resíduos Asp 208 e Arg 228 estão envolvidos diretamente, cada um estabelecendo uma ponte de hidrogênio com uma das duas moléculas de água do sítio S2. Dois resíduos, Asp 10 e Asp 19, são compartilhados pelos dois cátions (HARDMAN e AINSWORTH, 1972; LORIS et al., 1998).

A ligação de Mn^{2+} ao sítio S1 da apo-Con A, a proteína desmetalizada, induz a uma mudança conformacional na proteína que resulta na formação do sítio S2. A ligação de Ca^{2+} ao sítio S2 induz a formação do sítio de ligação a carboidrato. A energia de ativação do processo de conversão da forma inativa para a ativa é de 22 Kcal.mol⁻¹, com uma constante de tempo de 17 min a 5°C (BROWN *et al.*, 1977).

As determinações de seqüências primárias das lectinas de plantas têm sido feitas por técnicas convencionais de derivatização e seqüenciamento de proteínas, através da degradação de Edman e, nos últimos dez anos, pelo seqüenciamento dos genes correspondentes. A comparação das seqüências de aminoácidos permite agrupar as lectinas de plantas superiores em quatro famílias homólogas e distintas: a família das lectinas de leguminosas, a daquelas com especificidade por quitina, e as famílias das lectinas de *Amaryllidaceae* e de *Moraceae*, respectivamente.

A homologia entre diferentes lectinas obtidas de uma família de plantas simples, de legumes, sugere fortemente uma origem genética comum para estas proteínas. Por essa razão, as lectinas podem ser agrupadas em famílias que têm sua estrutura primária conservada. Além disso, a homologia sugere um ancestral comum para os genes codificadores dessas proteínas, que se torna mais evidente quando se comparam seqüências de lectinas de plantas de uma mesma família (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991).

As sementes de leguminosas constituem a maior e a mais estudada família de lectinas vegetais. Como resultado desses estudos, diversas proteínas desse grupo se encontram completamente seqüenciadas, podendo-se citar: *Canavalia ensiformis*

```

P.vulgaris Arc4 MASSKFFTVL----FLVLLSHANSATETSFNIDAFNKTNLILQGDATVTSKGYLRLTDDT
P.vulgaris Arc5 MASSN---LLSLALFLVL-THANSASQTFSSDFRNETNLILQGDAPSSSSGQLRLTNLK
P.vulgaris AI4 MASS---NLLSLALFLVLLTHANSATETSFI IDAFNKTNLILQGDATVSSNGNLQLSHNS
P.vulgaris lec MASSN---LLSLALFLVLLTHANSASQTSFSFQRFNETNLILQGDATVSSGQLRLTNVN
P.acutifolius AI MASSKFCVSLVSLVFLVLLTHANSACNTSFNFHFSFNETNLMLQGGQATVSSNGNLQLN--T
P.acutifoliuslec MASSNFSTVLSLALFLPLLTHANSANDISFNFQRFNETNLILQGDASVSSGQLRLTNLN
P.lunatus AI2 MASSKFCVLSLALFLVLLTHANSANDIFFNIDRFNETNLILQGDATVSSKGQLELTDDET
P.lunatus Arc MASSKFSTVLSLALFLVLLTHANSAELEFSFNFQTFNAANLILQGNASVSSGQLRLTEVK
P.maculatus AI MASSKFSTVLSLALFLVLLSHANSANDISFNITTFNETNLILQGDATVSSNGNLQLNDDK
      ****      :*      ** * :*****      * :      ** :***:** :. :.* **.*.

P.vulgaris Arc4 ED-----SMGRAFYSVPIQIRDSTTGNVASFSTNFTFIMD---EANSTYGLAFALVPVG
P.vulgaris Arc5 SNGEPTVGSLLGRAFYSAPIQIWDNTTGTVASFATSFTFNIQVPPNAGPADGLAFALVPVG
P.vulgaris AI4 YD-----SMSRAFYSAPIQIRDSTTGNVASFDSNFTMNRITNTHQDASVSSGQLRLTNLN
P.vulgaris lec DNGEPTLSSLLGRAFYSAPIQIWDNTTGAVAASPTSFTEFNIDVPNNSGPADGLAFVLLPVG
P.acutifolius AI MD-----SMCSAFYSAPIQIRDSTTGNVASFDNFTINMTSYCKANSAGLDLAFALVPV-
P.acutifoliuslec DNGEPTLSSLLGRAFYSTPIQIWDSTTGAVASFATSFTFNIQVPPNAGPADGLAFALVPVG
P.lunatus AI2 DF-----SMGRAFYSAPIQMRDST-GN-ASFDTNFTFNMRRPSNKVTSYGLAFALVPVD
P.lunatus Arc SNGEPKVASLGRAFYSAPIQMRDST-GN-ASFDTNFTFNMRRPSNKVTSYGLAFALVPVD
P.maculatus AI SD-----SMGRAFYSAPIQIRDSTTGNVASFDNFTINLPL---DVNSPYGLAFALVPVG
      :      * :      ****.***: * * * * :      :.***: :      . .      ** *.*:**

P.vulgaris Arc4 SEPKANGPFLGLFRKPGYDPEAHTVAVVFINH--WYPNANGRHLGIDVNSILPIES-KPW
P.vulgaris Arc5 SQPKHKGGLLGLFNNDKYDSNAHTLAVELDTCCNDRDWDPKPRHIGIDVNSIRSIKT-TPW
P.vulgaris AI4 -QPESKG-----DVTVEEDTF-----LNRIGIDVNN-NDIKS-VPW
P.vulgaris lec SQPKDKGGLLGLFNNYKYDSNAHTVAVEFDTLYNVHWDPKPRHIGIDVNSIKSIKT-TTW
P.acutifolius AI -QPKSKGRLGLFKTPDYDRNAGNVVEEDTF-----RRRISIDGNH-NDIES-VPW
P.acutifoliuslec SKPKDRGGLLGLFDG--SDSRAHTVAVEFDTLYNRDWDPRERHIGIDVNSIKSIKT-TPW
P.lunatus AI2 SQPKRKGRLGLFNTPENDINAHTVAVVFDTF-----SNRIGIDVNSVQSIES-KSW
P.lunatus Arc SQPKRKGRLGLFNTPENDINAHTVAVVFDTF-----SNRIGIDVNSVQSIES-KSW
P.maculatus AI SQPKRKGFRVGLFDKVEYDPKARTVAVAFNLNY--LYPSPNGRDVVIVDVNSIHPYRSHQPR
      :*: .*      .:.* : .      : * *      :.

P.vulgaris Arc4 YV---GQKHAVVQITYVSSKKVLTVSLLYPSTGTMYDLYAKKVELEEVEYDWSVGVGSA
P.vulgaris Arc5 DF---VNGENAEVLITYESSTKLLVASLVYPSQKTSFIV-SDTVDLKSVLEPWVSVGVGSA
P.vulgaris AI4 DVHDY-DGQNAEVRITYNSSTKVFSVLSNPSTERATTS-LPQWRLEKEVYDWSVGVGSA
P.vulgaris lec DF---VKGENAEVLITYDSSTKLLVASLVYPSLKTFSIV-SDTVDLKSVLEPWVIVGFTA
P.acutifolius AI DVDDY-DGQNAEVRITYNSSTKVLAVALLNLSLSTGKSNNV-SARMELEKKLDDWVSVGVGFIG
P.acutifoliuslec DF---GQGEDAEVLITYDSSTKLLVASLVYPSQKTSFIV-SDTVDLKSVLEPWVVRVGVGSA
P.lunatus AI2 DFRHY-KGQKAEVRITYNSSSKVLAASLFYPSGKRYDV-SAKVELEEVLDDWVSVGVGSA
P.lunatus Arc DFRHY-KGQKAEVRITYNSSSKVLAASLFYPSGKRYDV-SAKVELEEVLDDWVSVGVGSA
P.maculatus AI RLRHVIPERQVNVIRITYNSSMTILAVHEFSPSTEQIYDV-STKVELEENVDDWVSVGVGSA
      .      ... * *** ** . : .      *      * : . : : ** * ** .

P.vulgaris Arc4 TSGANQWSYETHDVISWSFSSKFS--DDDTSER---SNILLNNIL
P.vulgaris Arc5 TTGINKGNVETNDVLSWSFASKVSD--GT-TSEGLNLAKLVLNKIL
P.vulgaris AI4 TSGAYQWSYETHDVISWSFSSKFINKLQD-KSER---SNVVLNQIL
P.vulgaris lec TTGITKGNVETNDILSWSFASKLSD--GT-TSEALNLANFALNQIL
P.acutifolius AI TSGVHYYSFETRDVFSWSFSSKFSQ--HT-TSER---SNILNQIL
P.acutifoliuslec TSGITKGNVETNDLLSWSFASKLSD--GT-TSEGLNLANFVNLNQIL
P.lunatus AI2 TSAYK---ETHDVISWSFSSSLSD--DT-TSEP---SNILLNKIL
P.lunatus Arc TSAYK---ETHDVISWSFSSSVSD--DT-TSEP---SNILLNKIL
P.maculatus AI TS---LNRETPDVLDSFSSSLSD--DT-TSER---SNIVLNQIL
      * :      ** * :.***:* . :      .**      :. : : ** *

```

Figura 1 Alinhamento dos aminoácidos de nove cadeias protéicas de espécies do gênero Phaseolus. Estão dispostas as cadeias de: arcelinas 4 e 5, inibidor de amilase 4 e lectina PHA-L de *P. vulgaris*; inibidor de amilase e lectina de *P. acutifolius*; inibidor de amilase 2 e arcelina de *P. lunatus*; e inibidor de amilase de *P. maculatus*. Ao final de cada bloco estão representadas as respectivas posições de consenso de homologia (*), de similaridade (:), de divergência (.) e de introdução de espaços (-) entre os resíduos.

(CUNNINGHAM *et al.*, 1975), *Dioclea grandiflora* (AINOUZ *et al.*, 1987), *Baubinia purpurea* (KUSUI *et al.*, 1991).

Os grupos de lectinas exibem em geral alta homologia quando suas seqüências de aminoácidos são apropriadamente alinhadas entre plantas de mesma filogenia. A comparação das cadeias primárias de lectinas com especificidade por quitina, isoladas de sementes de gramíneas: trigo (WGA), cevada (BL) e arroz (RL) e dos rizomas de *Urtica dioica*, revelou uma grande homologia, apesar da distância filogenética entre elas (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991). Todas possuem em comum um domínio de 43 resíduos de aminoácidos, rico em glicina e cisteína que se liga à quitina. Também através do alinhamento das seqüências primárias de várias proteínas do gênero *Phaseolus* foi possível identificar as semelhanças e especificidades dos genes que compõem a grande família das lectinas (MIRKOV *et al.* 1994). Um exemplo desse alinhamento é mostrado na Figura 1, constando as seqüências de arcelinas, lectinas e inibidores de α -amilase (FINARDI FILHO *et al.* 1996). Estas duas últimas são derivadas das arcelinas, proteínas de reserva que foram perdidas durante o processo evolutivo do feijoeiro e que, em alguns exemplares de *P.vulgaris* selvagem, apresentam resistência ao ataque de insetos (OSBORN *et al.* 1988; FORY *et al.* 1996).

Do mesmo modo, aplicando-se a técnica de alinhamento entre as *Amaryllidaceae* evidencia-se a presença de uma família de lectinas de *Galanthus nivalis*, e de exemplares dos gêneros *Narcissum* e *Hippeastrum* com alto grau de homologia, tanto pela seqüência de nucleotídeos, a partir do cDNA, quanto pela seqüência de aminoácidos (VAN DAMME *et al.*, 1992). Mais um grupo estrutural distinto é formado pelas lectinas encontradas em

```

A. ascalonium ---STPSP-KL-MSVATVATILITILASTCMARNVLVNNEGLYAGQSLVEEQ
A. cepa -----TVATILITILASTCMARNVLVNNEGLYAGQSLVVEQ
A. ursinum ---MAISVNCKI-IMVCAVGTILSILTPTSMGRNILLNNGEGLYAGQSLEEGS
A. porrum MGRITTPSP-KLIMSTTTVAAILTILASTCMARNLLTNGEGLYAGQSLDVEQ
                                     :*.:**:**.:*.:**:* *.:*****
                                     .

A. ascalonium YTFIMQDDCNLVLYEYSTPIWASNTGITGKNGCRAVMQPDGNFVVYVVKGR
A. cepa YTFIMQDDCNLVLYEYSTPIWASNTGVTGKNGCRAVMQADGNFVVYDVKGR
A. ursinum YKLIQDDCNLVLYEYSTQVWASNTGVSGRNGCRAVMQADGNFVYVDSNSR
A. porrum YKFIMQDDCNLVLYEYSTPIWASNTGVTGKNGCRAVMQKDGNFVVYDVNGR
*.:*****:**** :*****:*.:***** *****: :.*

A. ascalonium AVWASNSRRGNGNYILVLQKDRNVVIYGSDIWSTGTYRKKVGGTVVMAMNG
A. cepa AVWASNSRRGNGNYILVLQKDRNVVIYGSDIWSTGTYRKKVGGTVVMAMNG
A. ursinum AVWASQRRGNGNYILALQEDRNVVIYGTDIWSTGTYRKGVGGTVVTVING
A. porrum PVWATNSVRGNGNYILVLQDRNVVIYGSDIWSTGTYRRSAGGPVVMAMNG
.***:.* *****.**:*****:*****: .**.* .:.*

A. ascalonium TVDGGS AIGPVTVNQNVTA VRKVAAAAA
A. cepa TVDGGSVVGPVTVNQNVTA VRKVAAAA--
A. ursinum TVDAGSGMENVT-----ATAA--
A. porrum TVNGGSVVGPVTVNQNVTAIRKVGTSAA-
**.:** : * .:.*
    
```

Figura 2 Alinhamento dos aminoácidos das cadeias protéicas de quatro espécies do gênero *Allium* com suas respectivas posições de consenso de homologia (*), de similaridade (:), de divergência (.) e de introdução de espaços (-) entre os resíduos.

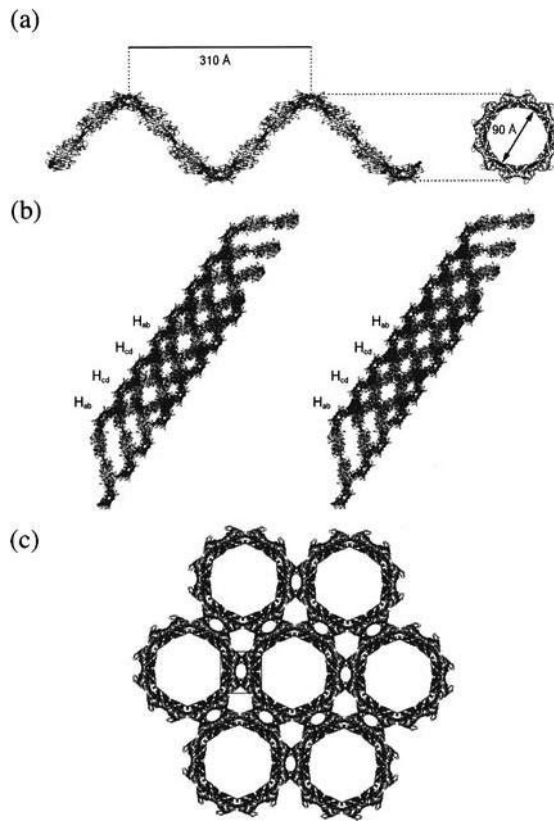


Figura 3 Modelo de estrutura cristalina de lectina que interage com receptores Flt3. a) Hélice simples formada por ligações cruzadas de dímeros canônicos de FRIL; b) Estéreo imagem de quatro super-hélices justapostas; c) Visão do pacote cristalino das super-hélices. Adaptado de HAMELRYCK et al., 2000.

bulbos da família *Allium*, que se caracterizam pelo baixo peso molecular e alta homologia. Entre elas destacam-se as lectinas de cebola (*Allium cepa*), cebola selvagem (*A. ascalonicum*), alho (*A. sativum*), alho porró (*A. porrum*) e *A. ursinum* (Figura 2). Este resultado, obtido através de busca em bancos de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov). ALTSCHUL *et al.*, (1997) associado a programas de alinhamento de seqüências (www.ch.embnet.org), evidencia neste último caso a similaridade das cadeias protéicas com até 76% de homologia.

Embora a maioria das lectinas de plantas mais bem caracterizadas tenha sido isolada de sementes da família *Leguminosae*, várias lectinas com propriedades biológicas interessantes tem sido recentemente obtidas da família *Moraceae*, incluindo a lectina KM⁺ de sementes de jaca – *Artocarpus integrifolia* (ROSA *et al.*, 1999).

As lectinas de sementes de *Moraceae* (*Artocarpus integrifolia* e *Maclura pomifera*) possuem uma alta homologia entre si, porém nenhuma similaridade foi detectada com

as demais lectinas de vegetais seqüenciados, o que revela a existência de uma família distinta de lectinas homólogas (YOUNG et al., 1989). Por exemplo, a jacalina isolada de *Artocarpus integrifolia* consiste de duas cadeias polipeptídicas, com uma subunidade α , de 133 resíduos, e uma subunidade β , de 20 resíduos. A análise das seqüências revelou que ambas subunidades apresentam variações em suas cadeias, indicando, assim, a existência de múltiplas isoformas da jacalina (YOUNG et al., 1989, 1991). Os cDNAs das isolectinas da jaca foram isolados, caracterizados e clonados. Estuda-se, também, seu potencial como veículo de fármacos (YANG e CZAPLA, 1993). Deve-se incluir ainda nesse grupo a frutalina, encontrada em sementes de fruta-pão, *Artocarpus incisa*, que apresenta a partir de resultados preliminares, uma estrutura similar à da jacalina (BRANCO, 1997; MOREIRA et al, 1998).

Recentes estudos têm usado propriedades físicas para caracterizar as interações de lectinas com carboidratos. A cristalização de glicoconjugados com lectinas leva a formação de estruturas diversas que dependem das valências de ligação aos carboidratos. Desse modo, a análise de cristalografia de R-X mostra lectinas divalentes formando estruturas lineares junto com glicoconjugados divalentes, enquanto formas bi ou tri-dimensionais são próprias de componentes com mais de duas valências, tanto da lectina quanto do carboidrato (HAMELRYCK *et al.*, 2000). Os autores, que estudaram as lectinas isoladas de *Dolichos lablab* que interagem com receptores Flt3, conhecida pela sigla FRIL, propõem estruturas cristalinas tubulares formadas por hélices compostas, que se associam em conjuntos simétricos (Figura 3). Estudos termodinâmicos das interações multivalentes lectina-carboidrato têm confirmado as estruturas em redes de formação quadrática e hexagonal que estariam funcionalmente vinculadas aos receptores biológicos na transdução de sinal (SACCHETTINI et al., 2001).

ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E ANTINUTRICIONAIS

As lectinas estão presentes em várias espécies vegetais comestíveis sendo uma decorrência inevitável a exposição do homem e animais a estas proteínas. Entre os alimentos de origem vegetal *in natura* e processados, cerca de 30% contêm lectinas ativas (NACHBAR e OPPENHEIM, 1980).

O primeiro grupo de lectinas que evidentemente tem um papel de defesa são as proteínas citotóxicas como a ricina e a abrina. Plantas que acumulam este tipo de proteínas são potencialmente tóxicas para a maioria dos organismos e, por essa razão, tornam-se protetoras ao ataque de eucariontes. Há, no entanto a possibilidade, de que alguns fungos ou insetos sejam capazes de inativar estas lectinas tóxicas por proteólise bem antes de elas causarem qualquer dano significativo (PEUMANS e VAN DAMME, 1995).

Tem sido mostrado que certas lectinas são altamente resistentes à hidrólise enzimática no trato gastrointestinal. BRADY *et al.* (1978) mostraram que a WGA pode ser recuperada intacta e biologicamente ativa em amostras fecais de indivíduos que haviam sido alimentados com dietas contendo germe de trigo. Em ratos alimentados com dietas

contendo lectina pura de *Phaseolus vulgaris* (PHA) foi recuperado, nas fezes, um teor de 90% das frações ingeridas, ainda na forma ativa (PUSZTAI *et al.*, 1986).

Dependendo da lectina presente em cada alimento ingerido, a intensidade do processo tóxico pode variar entre estados de completa ausência sintomatológica até a morte por ingestão de diminutas quantidades. Neste caso se encontram as RIPs, que são conhecidas como potentes agentes citotóxicos. Há relatos de efeito mortal das RIPs tipo II sobre animais superiores, incluindo humanos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995).

O fato de sementes de leguminosas serem consumidas por uma parcela considerável da população mundial, faz aumentar a preocupação de pesquisadores sobre o real significado das lectinas nas dietas, pois feijões crus (*Phaseolus vulgaris*) presentes em rações de ratos debilitam o desenvolvimento desses animais. Está claro que as lectinas de feijões, após a interação com receptores na superfície de células intestinais, são endocitadas, causando distúrbios sistêmicos. Há perda das microvilosidades intestinais de ratos alimentados com lectinas de feijão, diminuindo o ritmo de crescimento dos animais (ROSSI *et al.*, 1984). Hiperplasias de intestinos, de fígado e de pâncreas também foram observadas quando a lectina pura foi administrada a ratos. Aparentemente a hiperplasia pancreática pode ser a responsável pela diminuição dos níveis de insulina dos ratos alimentados com lectina de feijão (PUSZTAI *et al.*, 1986).

Adicionalmente, a lectina de *P. vulgaris* administrada aos ratos por via oral ocasionou certa atrofia do timo, que poderia ser causada pela proliferação bacteriana no intestino, com suspeita de dano no sistema imunológico (JAYNE-WILLIAMS e HEWITT, 1972). A ingestão de lectina de *P. vulgaris* também afeta o metabolismo de nutrientes, com um aumento na excreção de nitrogênio e no catabolismo lipídico (PUSZTAI *et al.*, 1986), conduzindo a uma debilidade geral, com perda de peso, desenvolvimento inadequado e eventual morte. Administradas parenteralmente podem diminuir a resistência a infecções (DICKINSON *et al.*, 1978), ou provocar tumores (SCHWARTZ e PAPPAS, 1976). Há ainda relatos de que, sob certas circunstâncias, as lectinas podem ser altamente alergênicas (MITCHELL e CLARKE, 1979).

Recentemente, resultados de ensaios nutricionais executados com lectinas de *Galanthus nivalis*, GNA, incorporadas em batatas causaram grande repercussão e polêmica (EWEN e PUSZTAI, 1999). Rações administradas a ratos tiveram adição da lectina em sua forma purificada e batatas geneticamente modificadas, GM, para expressar a GNA. Os autores afirmaram que as batatas GM foram responsáveis pelo retardo no desenvolvimento dos animais, com danos ao sistema nervoso. Porém, após uma auditoria interna, ficaram comprovadas falhas no delineamento experimental, de tal modo que os resultados não tiveram credibilidade. De qualquer forma, o fato relevante que ficou do ensaio foi a alta toxicidade da GNA, inadequada para ser empregada em plantas GM como barreira biológica contra pragas.

Mesmo entre as leguminosas, os dados da literatura apresentam posições divergentes dependendo das espécies ensaiadas. FIGUEROA *et al.* (1984), trabalhando com lectinas isoladas de *P. vulgaris*, constataram que a adição de 1% de lectina do feijão

Jalo provoca diminuição no crescimento, altera a glicemia sérica e também reduz a atividade da maltase e da invertase na mucosa intestinal de ratos. Em contraste, porém, as sementes de feijão veludo (*Mucuna pruriens*) não apresentam atividade aglutinante para nenhum tipo sanguíneo de humanos, de coelhos e de porcos, e mesmo a alta atividade de inibição de tripsina é drasticamente reduzida pelos procedimentos usuais de remolho e cocção (UDEDIBIE e CARLINI, 1998). Ainda entre as leguminosas, ensaios nutricionais com ratos alimentados com dietas contendo lentilhas (*Lens culinaris*) revelaram que as preparações contendo a lentilha integral, a fração globulínica e a casca das sementes reduziram a curva de crescimento dos animais, evidenciando a baixa digestibilidade protéica. Paralelamente no mesmo trabalho, os grupos de ratos que receberam lectina pura e fração albumina isenta de lectina na dieta não sofreram qualquer alteração significativa no desenvolvimento (CUADRADO *et al.*, 2002).

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS LECTINAS

Devido às características e propriedades bioquímicas, as lectinas vêm sendo utilizadas como valiosos instrumentos em pesquisas médicas e biológicas (Quadro 2).

As lectinas podem ser utilizadas para explorar superfícies celulares ligando-se à porção carboidrato de glicoproteínas ou de glicolipídios que se projetam da célula (SARKAR *et al.*, 1991). Pela sua versatilidade, as lectinas têm sido usadas, muito além da tipagem de células vermelhas do sangue, nos estudos de receptores químicos, estrutura presente nas hemáceas dos grupos sanguíneos (SAKAKIBARA *et al.*, 1985). Assim, estudos de inibição por açúcares simples com as lectinas de *Phaseolus limensis* e *Vicia craca*, específica para o grupo A, de *Lotus tetragonolobus* e *Anguilla anguilla*, específicos para o grupo O, forneceram evidências, de que N-acetilgalactosamina e L-fucose desempenham um papel importante na especificidade dos grupos A e O, respectivamente, e como agentes mitogênicos na lectina de *Phaseolus vulgaris*, PHA (SHARON e LIS, 1987). Outras três lectinas foram reconhecidas para o mesmo fim: o mitógeno de erva-dos-cancros, uma lectina de *Wistaria floribunda*, e a Con A (DOYLE *et al.*, 1975).

As lectinas mitogênicas também podem ser utilizadas para cariotipagem, determinação de sexo e detecção de cromossomos defeituosos devido à fácil visualização dos cromossomos nas células estimuladas (SHARON e LIS, 1989).

Lectinas de diferentes especificidades foram imobilizadas sobre suportes inertes e usadas como matrizes de afinidade para fins bastante variados. Assim, elas têm sido utilizadas em cromatografias de afinidade não só para o isolamento, como para a demonstração da natureza glicoprotéica de receptores de hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, imunoglobulinas e compostos relacionados (GIOANNINI *et al.*, 1982). Do mesmo modo, a cromatografia de afinidade em colunas com lectina imobilizada tem sido utilizada não apenas com propósitos preparativos, de isolamento de glicoproteínas de membrana, como analítico para separar glicopeptídeos que diferem pouco na composição e estrutura de carboidratos.

Quadro 2 Emprego de lectinas em atividades de pesquisa e em diagnóstico*

1 - Caracterização de carboidratos e de glicoconjugados.
2 - Estruturas de carboidratos complexos na superfície de células e de partículas subcelulares de animais, bactérias e vírus.
3 - Arquitetura de superfícies celulares e suas mudanças sob transformação maligna.
4 - Tipagem sanguínea, estudos estruturais de substâncias de grupos e subgrupos sanguíneos.
5 - Isolamento de subpopulações de linfócitos.
6 - Genética, biossíntese e função de glicoconjugados de superfícies celulares.
7 - Estimulação mitogênica de linfócitos, eventos após a iniciação da divisão celular, constituição cromossomal de células e detecção de anormalidades cromossômicas.
8 - Sítios de ligação específica carboidratos-proteínas.
9 - Análises estruturais dos modelos de interação proteína-proteína.
10 - Estimulação linfocitária e de citotoxicidade celular dependente de lectinas.
11 - Tipagem de microrganismos e parasitas (<i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania</i>).
12 - Modelos moleculares de transdução de sinal.
13 - Fatores de resistência em vegetais heterólogos.

* Adaptado de: MOREIRA *et al.* 1991; LORIS *et al.* 1998; DAM e BREWER, 2002.

Diversas lectinas, entre elas a Con A, a lectina de lentilha, a BSI de *Bandeiraea simplicifolia* I, as RCA I e II de *Ricinus communis*, a aglutinina de germe de trigo, e a jacalina, foram imobilizadas em suportes inertes e assim usadas como matrizes para purificar glicoproteínas (GIOANNINI *et al.*, 1982; SARKAR *et al.*, 1991).

Entre as aplicações analíticas de lectinas pode-se citar a reação imunoabsorvente com enzima, ELISA, que foi desenvolvida para detecção quantitativa de glicoproteínas dos envelopes do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da imunodeficiência de símios (SIV) utilizando a lectina de *Galanthus nivalis* (MAHMOOD e HAY, 1992).

Lectinas com especificidades distintas têm sido conjugadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC), com a finalidade de: analisar a superfície de bactérias fixadoras de nitrogênio, avaliar a distribuição de receptores para lectinas em embriões de camundongos transplantados (KIMBER, 1989) e estudar glicoproteínas de superfícies celulares de espermatozoides de caprinos (SARKAR *et al.*, 1991).

Diversas lectinas são capazes de diferenciar algumas espécies de microrganismos. Lectina de germe de trigo (WGA) aglutina a espécie *Neisseria gonorrhoeae* (SCHAEFER *et al.*, 1979), lectinas de *Glycine max*, *Abrus precatorius* e *Griffonia simplicifolia*, aglutinam apenas *Bacillus anthracis* e *Bacillus mycoidis* (COLE *et al.*, 1984) entre vários bacilos. O uso de lectinas em microbiologia clínica apresenta várias vantagens como, estabilidade,

atividade específica elevada, disponibilidade comercial de várias lectinas e habilidades em mostrar diferenças estruturais entre espécies (SLIFKIN e DOYLE, 1990).

O emprego da tecnologia do DNA recombinante tem demonstrado extrema utilidade em estudos de estrutura, biossíntese e função de lectinas de plantas (HAMELRYCK et al., 2000). Além desses, as técnicas de biologia molecular têm permitido a transformação genética de plantas para aumentar a resistência ao ataque de insetos predadores (SHADE *et al.* 1994) e a diminuição de fatores adversos pela presença de lectinas em vegetais comestíveis. Por exemplo, a inclusão de uma proteína inibidora de α -amilase, da mesma família das lectinas de feijão comum, em ervilhas proporcionou resistência da planta ao ataque de carunchos (SHADE *et al.* 1994). As mesmas ervilhas foram empregadas em ensaio nutricional de ratos sem causar danos ao desenvolvimento e tampouco alterar os parâmetros bioquímicos e clínicos de controle de saúde dos animais (PUSZTAI *et al.*, 1999).

CONCLUSÕES

Além do entendimento atual dos mecanismos clássicos que regem as interações lectina-carboidrato estão em curso novas revelações sobre o papel das lectinas nas células e tecidos. Essas deverão trazer esclarecimentos sobre o metabolismo e a fisiologia de todos os seres vivos com indiscutíveis avanços para o transporte de substâncias bioativas para o interior das células, o desenvolvimento de modernas técnicas de diagnóstico, a transformação genética de organismos e a identificação e a eliminação de fatores adversos de plantas.

Abrem-se, portanto, alternativas de desenvolvimento de novas variedades de plantas mais resistentes, mais bem adaptadas ao meio e que, ao mesmo tempo, se tornam mais úteis para diversas finalidades e empregos nas áreas de saúde, sobretudo para serem consumidas diretamente como alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCE

- AINOUZ, I.L.; MOREIRA, R.A.; CAMPOS, F.A.P.; RICHARDSON, M. BEGBIE, R.; STEWART, J.C.; WATT, W.B.; PUSZTAI, A. The isolation and amino acid sequence of the beta and gamma subunits of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*. *Phytochem.*, v.26, p.1435-1440, 1987.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, v.25, p. 3389-3402, 1997.
- BOHLOOL, B.B.; SCHMIDT, E.L. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium* – legume root nodule symbiosis. *Science*, v.185, p.269 – 271, 1974.
- BOLINI, R.; CHRISPPEELS, M.J. Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, v.142, p.292-298, 1978.
- BRADY, P.G.; VANNIER, A.M.; BANWELL, J.G. Identification of the dietary lectin, wheat germ agglutinin, in human intestinal contents. *Gastroenterol.*, v.75, p.236-239, 1978.

- BRANCO, C.C.C. Sementes de fruta-pão (*Artocarpus incisa L.*), estudos bromatológicos e isolamento e caracterização de uma lectina. São Paulo, 1997. 121p. Tese. Doutorado em Ciência de Alimentos Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Universidade de São Paulo.
- BROWN, R.D.; BREWER, C.F.; KOENIG, S.H. Conformation states of concanavalin A: kinetics of transitions induced by interaction with Mn^{2+} and Ca^{2+} ions. *Biochemistry*, v.16, n.17, p.3883-3896, 1977.
- CHRISPEELS, M.J.; HARTL, P.M.; FAYE, L. Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of Concanavalin A. *J. Biol. Chem.*, v.261, n.22, p.10021-24, 1986.
- CHRISPEELS, M.J.; RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell*, v.3, p.1-9, 1991.
- COLE, H.B.; EZZELL, J.W.; KELLER, K.F.; DOYLE, R.J. Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by lectin. *J. Microbiol.*, v.19, n.1, p.48-53, 1984.
- CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purification of a glucose manose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.55, n.3, p.261-273, 1995.
- CUADRADO, C.; GRANT, G.; RUBIO, L.A.; MUZQUIZ, M.; BARDOCZ, S.; PUSZTAI, A. Nutritional utilization by the rat of diets based on lentil (*Lens culinaris*) seed meal or its fractions. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.4371-4376, 2002.
- CUNNINGHAM, B.A.; WANG, J.L.; WAXDAL, M.J.; EDELMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F2. *J. Biol. Chem.*, v. 250, n.4, p.1503-1512, 1975.
- DAM, T.K.; BREWER, C.F. Thermodynamics studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.*, v. 102, p. 387-429, 2002.
- DATTA, P.K.; FIGUEROA, M.O.D.C.R.; LAJOLO, F.M. Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* seeds (pinhão). *Plant. Physiol.*, v.97, p.856-62, 1991.
- DIAZ, C.L.; MELCHERS, L.S.; HOOYKAAS, P.J.J.; LUGTENBERG, B.J.J.; KIJNE, J. W. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in *Rhizobium*-legume symbioses. *Nature*, v.338, p.579-581, 1989.
- DICKINSON, A.G.; FRASER, H.; McCONNELL, I.; OUTRAM, G.W. Mitogenic stimulation of the host enhances susceptibility to scrapie. *Nature*, v.272, p.54-55, 1978.
- DOYLE, R.J.; THOMASSON, D.L.; GRAY, R.F.; GLEW, R. H. Spectral changes accompanying the interaction between metal ligand and concanavalin A. *FEBS Letters*, v.52, p.185-187, 1975.
- EWEN, S.W.; PUSZTAI, A. Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *Lancet*, v.354, p.1353-1354, 1999.
- FINARDI FILHO, F.; MIRKOV, T.E.; CHRISPEELS, M.J. A putative precursor protein in the evolution of the bean α -amylase inhibitor. *Phytochem.*, v.43, p.57-62, 1996.
- FIGUEROA, M.O.R.; MANCINI, F.J.; LAJOLO, F.M. Ação antinutricional das fitohemaglutininas de *Phaseolus vulgaris*, L. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, v. 34, n.3, p.488-89, 1984.
- FORY, L.F.; FINARDI-FILHO, F.; QUINTERO, C.M.; OSBORN, T.C.; CARDONA, C.; CHRISPEELS, M.J.; MAYER, J.E. -amylase inhibitors in resistance of common beans to the Mexican bean weevil and the bean weevil. *J. Econ. Entomol.*, v.89, p.204-10, 1996.
- FRANKEL, A.E.; BURBAGE, C.; FU, T.; TAGGE, E.; CHANDLER, J.; WILLINGHAM, M.C. Ricin toxin contains at least three galactose binding sites located in B chain subdomains 1 α , 1 β , and 2 γ . *Biochemistry*, v.36, p.14749-14756, 1996.

- GIBSON, D.M.; STACK, S.; KREL, K.; HOUSE, J. A comparison of soybean agglutinin in cultivars resistant and susceptible to *Phytophthora megasperma* var. sojae (race 1). *Plant Physiol.* v.70, p.560-565, 1982.
- GIOANNINI, T.; FOUCAUD, B.; HILLER, J.M.; HATTEN, M.E.; SIMON, E.J. Lectin binding of solubilized opiate receptors evidence for their glycoprotein nature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.105, p.1128-1134, 1982.
- GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OZAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? *Nature*, v.285, p.66, 1980.
- HAMELRYCK, T.W.; MOORE, J.G.; CHRISP-EELS, M.J.; LORIS, R.; WYNS, L. The role of weak protein-protein interactions in multivalent lectin-carbohydrate binding: crystal structure of cross-linked FRIL. *J. Mol. Biol.*, v.299, p.875-883, 2000.
- HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C.F. Structure of the Concanavalin A at 2.4 Å resolution. *Biochemistry*, v.11, n.26, p.4910-4919, 1972.
- JAYNE-WILLIAMS, D.J.; HEWITT, D. The relationship between the intestinal microflora and the effects of diets containing raw navy beans (*Phaseolus vulgaris*) on the growth of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Appl. Bacteriol.*, v.35, p.331-345, 1972.
- KIMBER, S.J. Changes in cell-surface glycoconjugates during embryonic development demonstrated using lectins and other probes. *Biochem. Soc. Trans.*, v.17, p.23-7, 1989.
- KJEMTRUP, S.; BORKHSENIUS, O.; RAIKHEL, N.V.; CHRISP-EELS, M.J. Targeting and release of phytohemagglutinin from the roots of bean seedlings. *Plant Physiol.*, v.109, p.603-610, 1995.
- KNOX, R.B.; CLARKE, A.; HARRISON, S.; SMITH, P.; MARCHALONIS, J.J. Cell recognition in plant: determinants on the stigma surface and their pollen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.73, p.2788, 1976.
- KUSUI, K.; YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; OSAWA, T. cDNA cloning and expression of *Baubinia purpurea* lectin. *J. Biochem.*, v.109, p.899-903, 1991.
- LERNER, D.R.; RAIKHEL, N.V. The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. *J. Biol. Chem.*, v.267, n.16, p.11085-11091, 1992.
- LORIS, L.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1383, p.9-36, 1998.
- MAHMOOD, N.; HAY, A.J. An ELISA utilizing immobilized snowdrop lectin GNA for the detection of envelope glycoproteins of HIV and SIV. *J. Immunol. Methods*, v.151, p.9-13, 1992.
- MIRELMAN, D.; GALUN, E.; SHARON, N.; LOTAN, R. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature*, v.256, p.414-16, 1975.
- MIRKOV, T.E.; WAHLSTROM, J.M.; HAGIWARA, K.; FINARDI FILHO, F.; KJEMTRUP, S.; CHRISP-EELS, M.J. Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin-amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. *Plant Mol. Biol.*, v.23, p.1103-1113, 1994.
- MISHKIND, M.; RAIKHEL, N.V.; PALEVITZ, B.A.; KEEGSTRA, K. Immunocytochemical localization of wheat germ agglutinin in wheat. *J. Cell. Biol.*, v.92, p.753-764, 1982.
- MITCHELL, G.F.; CLARKE, A.E. Allergenicity of concanavalin a in mice. *Int. Arch. All. Appl. Immunol.*, v. 58, p.391, 1979.
- MOREIRA, R.A.; BARROS, A.C.H.; OLIVEIRA, J.T.A.; RICHARDSON, M. Comparative studies of lectins from seeds of the tube *Diocleae*. *Arq. Biol. Tecnol.*; v.28, p.173, 1985.
- MOREIRA, R.A.; CASTELO-BRANCO, C.C.; MONTEIRO, A.C.O.; TAVARES, R.O.; BELTRAMINI, L.M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. Seeds. *Phytochem.*, v.47, n.7, p.1183-1188, 1998.

- MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; AINOUIZ, I.L. Plant Lectins. In BRAZILIAN CONGRESS ON PROTEINS, 1st, *Proceedings*. Campinas, UNICAMP, 1991, p. 77-96.
- NACHBAR, M.S.; OPPENHEIM, J.D. Lectins in United States diet: A survey of lectins in commonly consumed foods and a review of literature. *Amer. J. Clin. Nutr.*, v.33, p.2338-2345, 1980.
- NICOLSON, G.L.; BLAUSTEIN, J.; ETZLER, M.E. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. *Biochemistry*, v.13, p.196-204, 1974.
- OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. *Seeds. Rev. Bras. Bot.*, v.14, p.61-66, 1991.
- OSBORN, T.C.; ALEXANDER, D.C.; SUN, S.S.M.; CARDONA, C.; BLISS, F.A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science*, v.240, p. 207-210, 1988.
- PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotech.*, v.36, p.113-8, 1992.
- PARIJS, J.V.; BROEKART, W.F., GOLDSTEIN, I.J., PEUMANS, W.J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, v.183, p.258-264, 1991.
- PEUMANS, W.J.; NSIMBA-LUBAKI, M.; PEETERS, B.; BROEKAERT, W.F. Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rhizomes. *Planta*, v.164, p.75-82, 1985.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, v.109, p.347-352, 1995.
- PUSZTAI, A.; GRANT, G.; BARDOCZ, S.; ALONSO, R.; CHISPEELS, M.J.; SCHROEDER, H.E.; TABE, L.M., HIGGINS, T.J.V. Expression of the insecticidal bean α -amylase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet. *J. Nutrition*, v.129, p.1597-1603, 1999.
- PUSZTAI, A.; GRANT, G.; DE OLIVEIRA, J.T.A. Local (gut) and systemic responses to dietary lectins. *IRCS Med. Sci.*, v.14, p.205, 1986.
- RAY, S.; AHMED, H.; BASU, S.; CHATTERJEE, B.P. Purification, characterization, and carbohydrate specificity of the lectin of *Ficus cunia*. *Carbohydr. Res.*, v.242, p.247-63, 1992.
- ROSA, J.C.; DE OLIVEIRA, P.S.L.; GARRATT, R.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: Amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the -prism fold. *Protein Sci.*, v.8, p.13-24, 1999.
- ROSSI, M.A.; MANCINI FILHO, J.; LAJOLO, F.M. Jejunal ultrastructural-changes induced by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins in rats. *Brit. J. Exper. Pathology*, v. 65, p. 117-123, 1984.
- SACCHETTINI, J.C.; BAUM, L.G.; BREWER, F. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry*, v.40, p.3009-3015, 2001.
- SAKAKIBARA, F.; KAWAUCHI, H.; TAKAYANAGI, G. Blood group B-specific lectin of *Plecoglossus altivelis* (ayu fish) eggs. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.841, n.1, p.103-111, 1985.
- SARKAR, M.; MAJUMDER, G.C.; CHATTERJEE, T. Goat sperm membrane: lectin-binding sites of sperm surface and lectin affinity chromatography of the mature sperm membrane antigens. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1070, p.198-204, 1991.

- SCHAEFER, R.L.; KELLER, K.F.; DOYLE, R.J. Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutination for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.*, v.10, p.669-672, 1979.
- SCHWARTZ, G.; PAPPAS, A. Tumor-enhancing and tumor-inhibiting in vivo effects of phytohemagglutinin: Study on proliferation of transplantable mouse melanoma. *European J. Cancer*, v. 12, p.599, 1976.
- SHADE, R.E.; SCHOEDER, H.E.; PUEYO, J.J.; TABE, L.M.; MURDOCK, L.L.; HIGGINS, T.J.V.; CHRISPPEELS, M.J. Transgenic pea seeds expression the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technology*, v.12, p.793-796, 1994.
- SHARON, N.; LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). *TIBS*, v.12, p.488-491, 1987.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, v.246, p.227-234, 1989.
- SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB Journal*, v.4, p.3198-3207, 1990.
- SIKDAR, S.; AHMED, H.; CHATTERJEE, B.P. A pH dependent low-molecular weight blood group A specific lectin from *Crotalaria striata* seeds: purification and carbohydrate specificity. *Biochem. Arch.*, v.6, p.207-215, 1990.
- SLIFKIN, M.; DOYLE, R.J. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.3, n.3, p.197-218, 1990.
- UDEDIBIE, A.B.I.; CARLINI, C. Brazilian *Mucuna pruriens* seeds (velvet bean) lack hemagglutinating activity. *J. Agric. Food Chem.*, v.46, p.1450-1452, 1998.
- VAN DAMME, E.J.M.; ALLEN, A.K.; PEUMANS, W.J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS. Letters*, v.215, n.1, p.140-144, 1987.
- VAN DAMME, E.J.M.; GOLDSTEIN, I.J.; VERCAMMEN, G.; VUYLSTEKE, J.; PEUMANS, W.J. Lectins of members of the *Amaryllidaceae* are encoded by multigene families which show extensive homology. *Physiol. Plantarum*, v.86, p.245-252, 1992.
- VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, v.183, p.258-262, 1991.
- VOZARI-HAMPE, M.M.; VIEGAS, C.; SAUCEDO, C.; ROSSETO, S.; MANICA, G.G.; HAMPE, O.G. A lectin from *Secchium edule* fruit exudate. *Phytochem.*, v.31, n.5, p.1477-1480, 1992.
- WANG, H.; NG, T.B. Ribosome inactivating protein and lectin from Bitter Melon (*Momordica charantia*) seeds: sequence comparison with related proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.253, p.143-146, 1998.
- WANG, J.L.; CUNNINGHAM, B.A.; EDELMAN, G.M.. Unusual fragments in the subunit structure of Concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.68, p.1130-1134, 1971.
- YANG, H.; CZAPLA, T.H. Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins. *J. Biol. Chem.*, v. 268, n.8, p.5905-5910, 1993.
- YOUNG, N.M.; JOHNSTON, R.A.Z.; SZABO, A. G.; WHATSON, D.C. Homology of the D-galactose specific lectins from *Artocarpus integrifolia* and *Maclura pomifera* and the role of an unusual small polypeptide subunit. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.270, n.2, p.596-603, 1989.
- YOUNG, N.M.; JOHNSTON, R.A.Z.; SZABO, A.G.; WHATSON, D.C.. The amino acid sequences of jacalin and the *Maclura pomifera* agglutinin. *FEBS Letters*, v.282, p.382-84, 1991.

Recebido para publicação em 07/10/02. Aprovado em 06/12/02.

ÍNDICE DE AUTOR / AUTHOR INDEX

- ALMEIDA, N., 71
ARAYA L., A, 71
- BOGUSZ JÚNIOR, S., 21
BRAZACA, S.G.C ver
 CANNIATTI-BRAZACA, S.G.
- CAMPOS, P.L., 33
CANNIATTI-BRAZACA, S.G., 85
CARVALHO, I.F., 125
CASTAÑO TOSTADO, E. ver TOSTADO,
 E.C.
COSTA, A.S., 33
COSTABEBER, I., 21
CURI, R., 105
- EMANUELLI, T., 21
- FIGUEIREDO, A.F.S., 51
FINARDI FILHO, F., 135
FISBERG, M., 71
FISBERG, R.M., 71
FRANCISCHI, R.P., 33
FUENZALIDA M., R., 7
- GARCIA. O.P., 71
GERMANO, R.M.A., 85
- HECK, M.C., 21
- LANCHA JÚNIOR, A.H., 33
LOPES, D.C.F., 51
LOYOLA, M.A.A., 71
- MANCINI FILHO, J., 105
MARCHINI, J.S., 125
MARQUEZI, M.L., 33
MORAIS, H.A., 51
MOREIRA, N.X., 105
MORIMOTO, J.M., 71
- NEGRETE C., R., 7
NORAMBUENO L., M., 7
- PEREIRA, L.O., 33
PEREIRA, P.M., 33
POVINELI, K.L., 135
- ROSCHEL, H.A.S., 33
ROSSATO, S., 21
- SANTORO, M.M., 51
SANTOS, J.S, 21
SAWADA, L.A., 33
SCAGLIUSI, F.B., 33
SILVA, V.D.M., 51
SILVESTRE, M.P.C., 51
- TORRES, E.A.F.S., 71
TOSTADO, E.C., 71
- VERA A., G., 71
- WITTIG DE PENNA, E., 7
- ZANIN, C.M., 125

ÍNDICE DE ASSUNTO

- Ácido adético ver EDTA
- Ácidos graxos
 - cis e trans, 105
- Aditivos alimentares ver Alimentos, aditivos
- Alergia, 125
- Alimentos
 - aditivos, 71
 - efeitos adversos, 125
- Alimentação, 21, 33
 - conduta, 33
- Anticorpos, 125
 - formação, 125
- Aspergillus oryzae, 51
 - protease, 51
- Chás digestivos, 7
 - atributos de qualidade, 7
 - princípios ativos, 7
- EDTA Ácido Edético, 71
- Eicosanóides, 105
- Escolares, 71
- Estrutura molecular, 135
- Fatores sexuais, 21
- Fenilcetonúria, 51
- Fenômeno bioquímico, 33
- Ferro, 85
 - absorção, 85
 - deficiência, 85
- Formação de anticorpos ver Anticorpos, formação
- Formulação dietética, 51
- Grupos por idade, 21
- Hidrólise enzimática, 51
- IDA Ingestão diária aceitável, 71
- Interação proteína-carboidrato ver Proteína-carboidrato interação
- Lectinas, 135
- Leite, 21, 51
 - em pó desnatado, 51
- Lipídios, 105
- Metabolismo e nutrição, 33
- Nutrição humana, 85
- Obesidade, 33
- Papaína, 51
- Peptídeo, 51
 - perfil
- Perfil peptídico ver Peptídeo, Perfil
- Protease, 51
- Proteína-carboidrato, 135
 - interação, 135
- Proteínas vegetais, 135
- Ratos Wistar, 33
- Renda Familiar, 21
- Resposta Humoral, 125

SUBJECT INDEX

- Acceptable daily intake, 71
- Age groups, 21
- Allergy, 125
- Antibody, 125
 - formation, 125
- Aspergillus oryzae*
 - protease, 51
- Biochemical phenomena, 33
- Cis*- and *trans* – fatty acids see Fatty acids
- Dietary formulation, 51
- Digestive tea see Teas, 7
- Eicosanoids, 105
- EDTA Edetic acids, 71
- Enzymatic hydrolysis, 51
- Family income, 21
- Fatty acids, 105
 - cis*- and *trans*-, 105
- Feeding behavior, 21; 33
- Food
 - additives, 71
 - adverse effects, 125
- Herbal teas see Teas
- Human milk see Milk
- Human nutrition, 85
- Humoral response, 125
- Iron, 85
 - absorption, 85
 - deficiency, 85
- Lectins, 135
- Lipids, 105
- Metabolism and nutrition, 33
- Milk, 21
 - human, 21
 - skimmed powder, 51
- Molecular structure, 135
- Nutrition,
 - human see human nutrition
- Obesity, 33
- Papain, 51
- Peptide profile, 51
- Phenylketonuria, 51
- Plant protein see Vegetable, protein
- Protein -carbohydrate, 135
 - interaction, 135
- Protease, 51
- Rats wistar see Wistar, rats
- School children, 71
- Sex factors, 21
- Teas, 7
 - active principles, 7
 - digestive, 7
 - herbal, 7
 - quality attributes, 7
- Vegetable protein, 135
- Wistar, rats, 33

INSTRUÇÕES AOS AUTORES/INSTRUCTIONS TO AUTHORS

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO/PUBLICATION RULES

Os artigos devem ser redigidos na ortografia oficial em uma só face e em espaço duplo, em folhas tamanho ofício (A4), com letras corpo 12, com margens de 3cm em cada um dos lados e enumeradas em algarismos arábicos no ângulo inferior direito. Não devem ser cortadas as palavras no final das linhas.

Devem ser encaminhados um (1) original e duas (2) vias;

Quando aceito para publicação enviar cópia em disquete no programa 3/5 6.0 MS Word for Windows.

Os artigos podem ser: originais, de revisão, atualização ou notas e informações:

- a) originais: divulgam resultados de pesquisas que possam ser replicados ou generalizados
- b) revisão: avaliação crítica da literatura sobre determinados assuntos. Devem conter conclusões ou comentários
- c) atualização: baseada na literatura recente, descritos e interpretativos da situação em que se encontra determinado assunto
- d) notas e informações: relatos curtos e notas prévias
- e) são aceitos artigos em inglês e espanhol

FOLHA DE ROSTO (IDENTIFICAÇÃO)

- a) título e subtítulo; versão em inglês e espanhol
- b) indicar título abreviado para legenda
- c) nome e sobrenome de cada autor; filiação à instituição e respectivo endereço
- d) nome do departamento onde o trabalho foi realizado
- e) nome e endereço do autor responsável
- f) se foi baseado em Tese, indicar o título, ano e instituição onde foi apresentada
- g) se foi apresentado em reunião científica, indicar o evento, local e data de realização

h) se foi subvencionado indicar o tipo de auxílio, nome do agente financeiro e o número do processo

- i) agradecimentos
 1. contribuições (assessoria científica, coleta e dados, revisão crítica da pesquisa)
 2. instituições (apoio econômico, material e outros)

Introdução: deve ser curta, definindo o problema estudado sintetizando sua importância

Métodos e materiais empregados, a população estudada, a fonte dos dados e critérios de seleção, dentre outros

Resultados: deve se limitar a descrever os resultados encontrados sem incluir interpretações/comparações

Discussão: deve começar apreciando as limitações do estudo, seguida da comparação com a literatura e a interpretação dos autores, extraindo conclusões, indicando novos caminhos para pesquisa.

Conclusão: para os artigos originais

RESUMO E PALAVRAS-CHAVE

- a) português, inglês e espanhol (até 250 palavras)
- b) descritores (usar o vocabulário) português e espanhol: Descritores em Ciências da Saúde, da Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde-LILACS; inglês: Medical Subject Headings-MESH, da National Library of Medicine

TABELAS E QUADROS

- a) apresentação em folhas separadas (enumeradas em ordem consecutiva, na ordem do texto) devem ter título breve

- b) não usar traços horizontais ou verticais internos

FIGURAS (FOTOGRAFIAS, DESENHOS, GRÁFICOS)

Apresentação em folhas separadas (enumeradas em ordem consecutiva, na ordem do texto); Legendas à parte

UNIDADES

Seguir as normas do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial-INMETRO, Homepage www.inmetro.gov.br

ABREVIATURAS E SIGLAS

- a) forma padrão da língua portuguesa e inglesa
b) não usar no título e no resumo

AGRADECIMENTOS: VER FOLHA DE ROSTO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (ABNT NBR-6023, 2000)

- a) ordem alfabética
b) abreviatura dos periódicos (Index Medicus) <[ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf](http://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf)>
c) todos os autores são citados, separados por ponto e vírgula (;)
CORDEIRO, J.M.; GALVES, R.S.; TORQUATO, C.M.
d) indicação do autor e data **no texto**: citar entre parênteses o nome do autor e data (BRIAN, 1929)
e) substituir **&** por **e** no texto e, por **ponto e vírgula (;)** nas referências bibliográficas (BRITO e PASSOS, 1930)
f) a exatidão das referências é de responsabilidade dos autores

REGULAMENTO DA NUTRIRE: REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO= JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF FOOD AND NUTRITION

Da Revista, Sede e Fins

Art.1º - A Nutrire: revista Brasileira de Alimentação e Nutrição=Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition, órgão oficial da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição – SBAN, criado em 1985, com sede* na Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 14, Cidade Universitária, São Paulo, Brasil, tem por finalidade publicar trabalhos técnico-científicos nas áreas de alimentação e nutrição.

Parágrafo 1: a Nutrire: revista Brasileira de Alimentação e Nutrição=Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition contará com as seguintes seções: artigos originais, de revisão, atualização, notas e informações, cartas ao editor, índices de autores e assuntos

Parágrafo 2: A Comissão Editorial, o Editor-científico e o Conselho Editorial compõem a Comissão de Redação.

*A sede da SBAN fica na jurisdição do Presidente eleito.

Art. 2º - A revista será editada, no mínimo, uma vez por ano.

Art. 3º – Periodicidade semestral.

Da Direção e Redação

Art. 4º - O editor-responsável será o Presidente da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição – SBAN.

Art. 5º - A Comissão Editorial será composta de 7 membros, com mandato de 5 anos e escolhidos dentre seus sócios efetivos. Os membros da Comissão elegerão o editor-científico pelo mesmo período.

Parágrafo único: a renovação de seus membros será de 4 e 3, respectivamente, a cada três (3) anos.

Art. 7º - Compete à Comissão Editorial e ao Editor-científico julgar todo o material encaminhado para publicação.

Art. 8º - Compete à Comissão Editorial fazer cumprir este regulamento e seu respectivo Cronograma.

Art. 9º - Compete ao Conselho Editorial a revisão científica dos artigos recebidos.

Parágrafo único: O Conselho Editorial não terá número de membros definidos e será composto de especialistas nacionais e internacionais de cada área de Alimentação e Nutrição indicados pela Comissão Editorial.

Art. 10º - Os trabalhos aprovados para publicação deverão trazer o visto do Editor-científico.

Parágrafo único: os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de recebimento, salvo as notas prévias.

Art. 11º - A data de recebimento e aprovação do artigo constará obrigatoriamente no final do mesmo.

Art. 12º - Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência. No caso de mais de um autor deverá expressamente ser indicado o autor responsável pela publicação

Art. 13º - A primeira prova gráfica será revisada pelo Editor-científico e conferida pelo autor que a rubricará. Haverá apenas duas provas gráficas.

Art. 14º - Os originais de trabalhos aceitos para publicação não serão devolvidos.

Art. 15º - É proibida a reprodução, no todo ou em parte, de trabalhos publicados na Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Ali-

mentação e Nutrição= Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition sem prévia autorização do autor e do Presidente da SBAN. É permitida a reprodução de resumos com a devida citação da fonte.

Art. 16º - Os autores deverão assinar a declaração de responsabilidade e transferência.

Art. 17º - Os artigos serão recebidos para publicação até 30 de janeiro e 30 de julho, de cada ano.

Art. 18º - A organização e revisão do material a ser publicado compete ao bibliotecário responsável pela normalização técnica e indexação.

Art. 19º - Os artigos devem ser enviados para o Editor-científico (1 original e 2 cópias):

Dra. Célia Colli

Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 B14 – Cidade Universitária, Cep 05508-900 – São Paulo, SP – Brasil

Referência Bibliográfica

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas, NBR 6023: Informação e Documentação; Referência, Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

2. Comitê Internacional de Editores de Periódicos Médicos. Requisitos de uniformidade para manuscritos submetidos a periódicos biomédicos. An Bras. Dermatol., Rio de Janeiro. V. 72, supl. 1, p.41-53, jul./ago., 1997. [4.ed]

3. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann. Intern. Med. V.126, p.36-47, 1997. [updated may, 1999, 5th ed.]

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO – SBAN

Presidente / President

Silvia Maria Franciscato Cozzolino

1º Vice-presidente / Vice president

Fernando Salvador Moreno

2º Vice-presidente / Vice President

Hélio Vannucchi

Secretário Geral / General Secretary

Célia Colli

1º Secretário / Secretary

Lilian Cuppari

2º Secretário / Secretary

Anita Sachs

1º Tesoureiro / Treasurer

Regina Mara Fisberg

2º Tesoureiro / Treasurer

Maria Cristina de Souza Campos Lerario

Secretários Regionais

AL Luci Tojal e Seara (luci.al@uol.com.br)

AM Lúcia K. Ozake Yuyama (yuyama@inpa.gov.br)

BA Roseanne Porto Dantas Maza (rosemazza@ufba.br)

CE Augusto Pimentel Guimarães (diretoria@nuteral.com.br)
e Carla Soraya Costa Maia (soraya@impax.com.br)

GO Maria Margareth Veloso Naves (mnaves@fanut.ufg.br)

MG Josefina Bressan R. Monteiro (jbrm@ufv.br)

PE Hernando Flores (hflores@nutricao.ufpe.br)

PI Nadir do Nascimento Nogueira (nadirn@uol.com.br)

RJ Luiz Carlos Trugo (lctrugo@iq.ufrrj.br)

RN Lúcia de Fátima C. Pedrosa (lpedrosa@ufmet.br)

SC Vera Lúcia C. Tramonte (veratramonte@ig.com.br)

Sócios Mantenedores / Supporting Partners

Ajinomoto Interamericana Ind. e Com. Ltda.

Coca Cola Indústrias Ltda.

Danone Ltda.

Kellogg Brasil & Cia.

Monsanto do Brasil Ltda.

Nestlé Brasil Ltda.

Pepsico do Brasil Ltda.

Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S. A.

Red Bull do Brasil Ltda.

Unilever Bestfood Brasil Ltda.

A Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição –
SBAN representa no Brasil a IUNS – International
Union of Nutritional Sciences

Endereço / Address

Sociedade Brasileira de Alimentação
e Nutrição - SBAN

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 / Bloco 14 - FCF / USP
5508-900 São Paulo – SP, Brasil

Tel: (11) 3091-3656 / 3091-3657 Fax: (11) 3815-4410

e-mail: sban@sban.com.br

www.sban.com.br



