



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**Avaliação da genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de
Xanthomonas campestris pv *pruni* através do ensaio cometa e teste de
micronúcleos.**

RUTILENE JACONDINO ROLL

**PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Julho de 2005**

RUTILENE JACONDINO ROLL

Avaliação da genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* através do ensaio cometa e teste de micronúcleos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Ms).

Orientador: Dr.^a Claire Tondo Vendruscolo

Co-Orientador: Dr.^a Angelita da Silveira Moreira

Pelotas, 2005.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Heden Marques Moreira

Dr.^a Francine Ferreira Padilha

Dr.^a Vanina Heuser

Ms. Izabel Vianna Villela

RUTILENE JACONDINO ROLL

Avaliação da genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* através do ensaio cometa e teste de micronúcleos.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof.^a Claire Tondo Vendruscolo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Área de Concentração: Agroindustrial, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA: de de

Prof. Dr. Heden Marques Moreira

Prof.^a Dr.^a Francine Ferreira Padilha

Prof.^a Dr.^a Vanina Heuser

Ms. Izabel Vianna Villela

Prof.^a Dr.^a Claire Tondo Vendruscolo
(Orientadora)

**A força não provém da capacidade física e, sim,
de uma vontade indomável.**

Mahatma Gandhi

Ao meu esposo, meus pais,
meu irmão, familiares e
amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao fim desta etapa, são muitas as pessoas a quem gostaria de agradecer pelo auxílio, estímulo e amizade, mas sei que por mais que me esforce irá faltar um ou outro nome (o que não os tornam menos importantes). Então, meus sinceros agradecimentos a todos!

À Universidade Federal de Pelotas e ao Centro de Biotecnologia pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Prof.^a Claire Tondo Vendruscolo pela orientação e, principalmente, confiança depositada durante o curso e execução do trabalho, contribuindo para meu amadurecimento profissional e pessoal.

À Dr.^a Angelita da Silveira Moreira pela co-orientação e esclarecimentos, dentro da sua área de atuação, contribuindo assim na elaboração do trabalho.

Ao Prof. Pedro Canisio Binsfeld pela paciência, amizade e ensinamentos transmitidos.

Aos Professores Odir Dellagostin, Paulo Post e Heden Moreira pela disponibilização de seus laboratórios e equipamentos, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Thomaz Lucia Jr. pela ajuda com a estatística.

Aos colegas de todos os Laboratórios do Centro de Biotecnologia da UFPEL, em especial aos dos Laboratórios: de Biologia Molecular, de Biopolímeros e de Biologia Celular e Molecular Vegetal, pelo apoio e amizade. Em especial aos amigos Milton Macedo Jr, Eduardo B. Ferreira Filho, Alexandre Rosa, Camila Coutinho, Fabiana Seixas, Sibeles Borsuk, Andréa Rocha, Janaína Venzke, Roberta

Collares Bressel, Carina Martins, Mariana Coutinho, Tiago Collares, Bárbara Pino e Ivana Hannemann Neves, pelo carinho, incentivo e auxílio em todos os momentos.

Aos colegas da UFRGS, Ms. Izabel Vianna Villela, Ms. Daniel Prá, Sílvia Frank e Dr.^a Vanina Heuser pelas incontáveis vezes em que me ajudaram na elaboração e execução do experimento, desde a disponibilização de materiais e laboratórios, até à amizade e paciência em esclarecer todo tipo de dúvidas.

À Ms. Lílian Amado (FURG), pela disponibilidade em esclarecer dúvidas referentes à técnica do ensaio cometa.

Aos funcionários do Biotério Central da UFPel, que não se limitaram apenas ao auxílio no manuseio com os animais, demonstrando também amizade e dedicação.

À minha orientadora de Graduação e amiga Prof.^a Gladis Aver Ribeiro por me ajudar muitas vezes que estava com dúvidas sobre alguns protocolos e também pelo carinho com que me amparou em momentos conturbados desta jornada.

Ao meu marido e amigo Rafael Martins pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis que surgiram durante a execução deste trabalho, ouvindo pacientemente todas as reclamações e frustrações no decorrer deste período.

Durante este trabalho, quando realizando o teste cometa, muitas vezes foi preciso conseguir amostras de sangue humano. Então, no Centro de Biotecnologia, os colegas já sabiam quando era tempo de coletar amostras porque eu andava com uma seringa na mão perguntando quem seria o doador. Felizmente, sempre encontrei pessoas dispostas a realizarem a doação. Agradeço a todos! Em especial à “Bilica” (Ms. Patrícia Diaz) que sempre estava disposta a colaborar. Porém, na maioria das vezes, eu doeie meu próprio sangue, o que foi muito bom porque assim obtive uma base de dados considerável sobre o perfil de danos no DNA das minhas células.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

As nuvens mudam sempre de posição, mas

são sempre nuvens no céu.

Assim devemos ser todo dia, mutantes,

porém leais com o que pensamos e sonhamos;

lembre-se, tudo se desmancha no ar,

menos o pensamento.

Paulo Baleki

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ácido Graxo de Cadeia Curta - **AGCC**

Ácido Desoxirribonucléico – **DNA**

Ácido Ribonucléico – **RNA**

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - **ANVISA**

Eritrócitos Policromáticos – **EPC**

Eritrócitos Policromáticos Micronucleados - **EPCMN**

Estados Unidos da América – **EUA**

Food Additives Organization – **FAO**

Índice de Dano - **ID**

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - **JECFA**

Micronúcleos – **MN**

North Regional Research Laboratory (Laboratório Regional de Pesquisas do Norte) – **NRRL**

Single Cell Gel Electrophoresis – **SCGE**

Patovar – **pv**

Potencial de Hidrogênio – **pH**

Produto a ser consumido - **p.s.c.**

Versus – **vs.**

World of Health Organization (Organização Mundial de Saúde) - **WHO**

Xanthomonas – **X.**

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ANEXOS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 <i>Xanthomonas campestris</i> e xantana.....	19
2.2 Propriedades Funcionais dos Polissacarídeos.....	20
2.3 Agentes Genotóxicos e Danos Genéticos.....	22
2.4 Fatores de Risco.....	24
2.5 Metodologia para Detecção de Agentes Genotóxicos.....	25
2.5.1 Ensaio Cometa.....	25
2.5.2 Teste de Micronúcleos.....	26
2.6 Legislação de Aditivos Alimentares.....	28
3. MATERIAL E MÉTODO.....	31
3.1 Xantana.....	31
3.2 Animais e Dosagem.....	32
3.3 Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) – Ensaio Cometa.....	33
3.4 Teste de Micronúcleos.....	35
3.5 Glicose e Colesterol.....	37
3.6 Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5. CONCLUSÃO.....	47
6. REFERÊNCIAS.....	49
7. ANEXOS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Precipitação (A), recuperação (B) e secagem do polímero.....	31
Figura 2	Acondicionamento dos camundongos em gaiolas de polipropileno.....	32
Figura 3	Acondicionamento dos camundongos em pequenos grupos do mesmo sexo e identificados individualmente com Ácido Pícrico.....	33
Figura 4	Preparação das lâminas, lise e eletroforese sob as condições indicadas para evitar danos ao DNA (sob luz vermelha).....	34
Figura 5	(A, B, C e D) Imagens de várias classes de danos no DNA (cometas).....	35
Figura 6	(A e B) Fotografias de cometas observados durante o experimento.....	35
Figura 7	Fotografia de eritrócitos micronucleados, observados durante o experimento.....	36
Figura 8	Médias obtidas do índice de colesterol no plasma sanguíneo, antes e depois do tratamento com as xantanas; Barras: desvio padrão da amostra.....	41
Figura 9	Médias obtidas do índice de glicose no plasma sanguíneo, antes e depois do tratamento com as xantanas; Barras: desvio padrão da amostra.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Índice e Frequência de Dano no DNA das células sanguíneas de camundongos tratados com as xantanas 1, 2 e 3 (cepas 06, 24 e comercial, respectivamente).....	39
Tabela 2	Média e o desvio padrão de eritrócitos policromáticos micronucleados da medula óssea de camundongos tratados com as xantanas 1, 2 e 3 (cepas 06, 24 e comercial, respectivamente).....	40

LISTA DE ANEXOS

Anexo A Tabela I de Aditivos Intencionais (Decreto Lei nº 55.871 de 1965), revisada pela Resolução CNS/MS nº 04 de 24 de novembro de 1988.....	57
Anexo B Exemplo de metodologia básica utilizada para o SCGE (ensaio cometa). Rojas <i>et al</i> (1999).....	79

RESUMO

Entre o vasto número de tipos de polissacarídeos produzidos naturalmente, por plantas, algas e bactérias, xantana é um dos poucos que tem propriedades funcionais com amplo espectro de uso bem como produção industrial em grande escala. É o segundo biopolímero a ser desenvolvido por um processo economicamente viável, e continua a ser o mais importante biopolímero na aplicação em alimentos devido às suas propriedades funcionais. As propriedades químicas e físicas da xantana comercial, principalmente a viscosidade e a estabilidade em relação a variações de pH e temperatura, fazem com que este polissacarídeo seja amplamente utilizado na indústria alimentícia, dentre outras, como espessante e estabilizante de suspensões e emulsões. Devido a xantana do patovar pruni ser um material novo e ainda não utilizado em alimentos, testes devem ser conduzidos de acordo com a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) para estabelecer a sua segurança. Com base no aumento da utilização destes polímeros na indústria alimentícia e, aos poucos dados referentes à genotoxicidade e aos efeitos sobre os índices de colesterol e glicose dos mesmos, torna-se importante a realização de um estudo sobre os danos ou benefícios que estes polímeros podem proporcionar. No presente estudo, foram usadas experimentalmente as xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 da bactéria *Xanthomonas campestris* pv pruni e a xantana comercial produzida pela mesma espécie, porém pelo patovar campestris (Jungbunzlauer), como componente adicional na dieta de camundongos, com o objetivo de avaliar o potencial genotóxico destes biopolímeros, neste modelo animal, através do ensaio cometa e do teste de micronúcleos; além de verificar os índices de colesterol e glicose. Os dados do ensaio cometa e do teste de micronúcleos foram avaliados e, então, observou-se que as xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24, assim como a xantana comercial, não apresentaram valores significativamente superiores aos controles negativos, na indução de danos no DNA através dos testes utilizados. Além disso, foi observada uma tendência a diminuir os índices de colesterol e glicose, nos tratamentos com as xantanas, embora estes valores não tenham sido significativamente inferiores ao do grupo controle.

Palavras-chave: *Xantana*. *Ensaio cometa*. *Micronúcleos*. *Colesterol*. *Glicose*.

ABSTRACT

Among the vast number of types of polysaccharides produced in nature, by plants, algae, and bacteria, xanthan is the one of the few that has functional properties leading to a broad spectrum of uses as well as commercial production in large quantities. It is the second microbial polysaccharide to be developed for an economically process, and it has continued to be the single most important biopolymer in food applications because of this useful properties. The chemical and physical properties of commercial xanthan mainly viscosity and stability with relation to temperature and pH variations, it makes that polysaccharide to be utilised a lot of for food industries, like as thickener and stabilizer of suspensions and emulsions. Because xanthan by patovar pruni is a new material never before introduced into foods, tests should be conduct in conformance with Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) for stablish its safety. And due to a few studies about the genotoxical mighty of xanthan, has been important to make a work about it. In this study, were experimentaly used xanthans produced by 06 and 24 strain from *Xanthomonas campestris* pv pruni and commercial xanthan from the same bacteria, but by pv campestris (Jungbunzlauer), like a additional component of mice diet, with aim of genotoxical evaluation in this animal model, through comet assay and micronuclei test. The comet assay and micronuclei test data were evaluated and, then, were able to comply no increase DNA damage induced by xanthans evaluated, through of utilised tests. Furthermore, was observed a tendency to decrease cholesterol and glucose levels, in the treatment with xanthans, although its values doesn't have been significantly inferior to control group.

Keywords: *Xanthan gum*. *Comet Assay*. *Micronuclei*. *Cholesterol*. *Glucose*.

1 INTRODUÇÃO

A saúde dos indivíduos é influenciada por fatores hereditários, nutricionais, mutacionais e ambientais, com os quais eles vivem. Populações expostas a agentes físicos, químicos ou ambientais podem sofrer mutações, câncer e defeitos congênitos (BASSAN, 2003). A maioria destes agentes tem origem artificial, ou seja, são produzidos pelo homem, embora ocorram substâncias tóxicas naturais provenientes de bactérias, fungos, plantas e animais. Os danos que causam podem ser de natureza química, física ou biológica e, em alguns casos, genética. As substâncias tóxicas que agem no material genético, especialmente no DNA, causando alterações no seu código são ditas genotóxicas ou mutagênicas, podendo provocar mutações gênicas e/ou cromossômicas (ARNAIZ, 1997). Muitas dessas substâncias podem ser encontradas nos alimentos e, por esse motivo existe legislação específica para a liberação de aditivos, como por exemplo, a xantana.

As propriedades químicas e físicas da xantana, principalmente a viscosidade e a estabilidade em relação a variações de pH e temperatura, fazem com que este polissacarídeo seja amplamente utilizado na indústria alimentícia, dentre outras, como espessante e estabilizante de suspensões e emulsões (PAZUR *et al*, 1995).

De acordo com Sutherland (1983), xantana é um heteropolissacarídeo polianiónico, produzido por bactérias Gram negativa do gênero *Xanthomonas*. Comercialmente tem sido produzido por *X. campestris* pv *campestris* cuja composição química, estrutura e segurança em alimentos são conhecidos há muitas décadas. Dentre o grande número de polissacarídeos produzidos *in natura* por

plantas, algas e bactérias, a xantana é um dos poucos que apresentam propriedades funcionais com amplo espectro de uso, bem como produção comercial em larga escala. Depois da dextrana, ela foi o segundo polissacarídeo microbiano a ser desenvolvido por um processo economicamente viável e continua sendo, ainda, o mais importante polissacarídeo microbiano utilizado em alimentos, devido as suas propriedades funcionais (JEANNES, 1974; SUTHERLAND, 1983; GARCÍA-OCHOA *et al*, 2000).

Em função da composição e propriedades de alguns polissacarídeos solúveis, tem sido discutida a possibilidade de utilizá-los como ingredientes no desenvolvimento de alimentos funcionais (ou nutracêuticos), visando benefícios como a redução nos índices de colesterol e problemas gastrointestinais e, conseqüentemente, diminuindo o risco de doenças do coração e câncer de cólon em humanos. Estes efeitos foram observados com sucesso em vários estudos, com animais e humanos, utilizando diferentes polissacarídeos, dentre eles: xantana, goma guar, gelana e amido de milho pré-gelatinizado. Tais resultados fazem com que fique cada vez mais popular a utilização destes polissacarídeos, principalmente os mais complexos, como aditivos em alimentos (CASTRO *et al*, 2003; SLAVIN & GREENBERG, 2003).

Novas bactérias do gênero *Xanthomonas*, potencialmente produtoras de xantana, têm sido continuamente testadas com relação à quantidade e qualidade do polissacarídeo produzido. O Laboratório de Biopolímeros do Centro de Biotecnologia – UFPel, que vem estudando o patovar pruni de *X. campestris*, verificou que as xantanas produzidas por esse patovar apresentam composição química diferenciada das que são atualmente comercializadas.

Baseado nos dados acima foi despertado o interesse em investigar se a ingestão dos polissacarídeos produzidos pelas cepas 06 e 24 de *X. campestris* pv pruni podem causar danos no DNA ou nos cromossomos, utilizando o ensaio cometa e o teste de micronúcleos (MN) para avaliar o seu potencial genotóxico em células animais, além de verificar se há alteração nos índices de colesterol e glicose, como efeito hipolipidêmico e hipoglicêmico, proposto por alguns pesquisadores nos tratamentos com polissacarídeos.

O ensaio cometa é uma técnica rápida, simples e precisa para medir e analisar quebras no DNA das células individuais. Em princípio, células de qualquer organismo podem ser usadas para investigação e somente pequenas amostras

destas são necessárias. Os dados do ensaio cometa são normalmente comparados com os do teste de micronúcleos o qual detecta quebras ao longo da fita do DNA com perda cromossômica. O teste de micronúcleos serve para detectar danos irreparáveis no DNA, enquanto que o ensaio cometa detecta danos que poderão ser corrigidos posteriormente pelo sistema de reparo do DNA (HEUSER *et al*, 2002).

Hidrocolóides (polissacarídeos) como aditivos raramente mostram toxicidade em animais de laboratório, embora uma alta concentração destes na alimentação diária possam reduzir o crescimento ou diminuir a digestibilidade de alguns nutrientes (MALLET *et al*, 1984). Além disso, devido à viscosidade destes hidrocolóides e ao seu alto peso molecular, a absorção de determinadas substâncias como vitaminas (C e B₁₂) e minerais (zinco, ferro) fica comprometida, e a carência destes micronutrientes pode desencadear a formação de danos no DNA. Estas duas características também conferem efeito hipocolesterolêmico e hipoglicêmico observado para diversos tipos de polissacarídeos (ODIN, 1997; FRANKE *et al*, 2005a; FRANKE *et al*, 2005b), com base no mesmo mecanismo.

No presente estudo, foram ministradas experimentalmente xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 da bactéria *Xanthomonas campestris* pv *pruni* e uma xantana comercial (Jungbunzlauer) em camundongos e, testou-se o potencial genotóxico neste modelo animal, com intuito de verificar, preliminarmente, a ausência de genotoxicidade das xantanas produzidas pelo patovar *pruni*. Além de avaliar os índices de glicose e colesterol com o objetivo de verificar possível influência da xantana na absorção destes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Xanthomonas* e Xantana

Xanthomonas campestris são microrganismos fitopatogênicos de ocorrência natural, aeróbios, Gram negativos, móveis por um único flagelo. Eles produzem um pigmento amarelo, insolúvel tanto em água quanto em ágar. Durante o seu cultivo, apresentam a capacidade de produzir a goma xantana, um polissacarídeo natural e um importante biopolímero industrial (HAYWARD, 1966).

Xantana é um polímero secretado no meio de cultura (exopolímero), e formado por mais de um tipo de monossacarídeo (heteropolissacarídeo). Suas propriedades químicas e físicas, principalmente a viscosidade e a estabilidade em relação a variações de pH e temperatura, fazem com que este polissacarídeo seja amplamente utilizado na indústria alimentícia, dentre outras, como espessante e estabilizante de suspensões e emulsões (PAZUR *et al*, 1995; MORRIS, 1996; TESSMANN, 2002).

A xantana foi o segundo polissacarídeo microbiano usado na indústria de alimentos, como espessante, emulsificante, estabilizante e agente de suspensão, aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) desde 1969. A estabilidade de suas soluções a temperatura permite o uso em processos em que são necessários congelamentos e descongelamentos. Seu uso foi aprovado no Canadá, Dinamarca e Nova Zelândia [SANDFORD, 1979]. No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55.871

da Legislação Brasileira de Alimentos [ABIA, 1965]. As concentrações permitidas nos diferentes tipos de alimentos estão especificados na Tabela de Aditivos Intencionais [ABIA, 1992] (VENDRUSCOLO, 1994, p. 7).

Este polímero foi descoberto em 1950, no Laboratório Regional de Pesquisas do Norte (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. A produção comercial começou em 1964; os maiores produtores têm sido Merck e Pfizer nos EUA, Rhône Poulenc e Sanofi-Elf na França e Jungbunzlauer na Áustria (GARCÍA-OCHOA *et al*, 2000).

A composição química da xantana produzida pelo patovar campestris foi determinada por Jeannes e seus colaboradores (1961), sendo composta por *D*-glicose, *D*-manose e Ácido D-glicurônico, na proporção de 2,8:3:2, apresentando ainda os grupos acetila e pirúvico. Sua estrutura foi determinada por Jansson *et al* (1975) como sendo um heteropolissacarídeo formado por uma cadeia principal do tipo celulósica, com ligações do tipo β (1-4) e cadeias laterais trissacarídicas formadas por duas unidades de manose alternadas com ácido glicurônico.

A distribuição do peso molecular da xantana varia de $2 \cdot 10^6$ a $20 \cdot 10^6$ Da. Esta distribuição de peso molecular depende da associação entre cadeias formando agregados de algumas cadeias individuais. As variações nas condições de fermentação usadas na produção são fatores que podem influenciar no peso molecular da xantana (GARCÍA-OCHOA *et al*, 2000). O peso molecular e o volume dos substituintes ácido pirúvico e acetila da xantana dependem da cepa de *Xanthomonas* (CADMUS *et al*, 1978; KENNEDY *et al*, 1982), da composição do meio e das condições operacionais usadas na produção (CADMUS *et al*, 1978; SOUW & DEMAÏN, 1979).

2.2 Propriedades da Xantana e Polissacarídeos

Nas últimas décadas, polissacarídeos emergiram como uma importante classe de produtos naturais bioativos. Atividades antitumoral, imunoestimulante, anticomplemento, antiinflamatória, anticoagulante, antiviral, hipoglicêmica e hipocolesterolemizante têm sido relatadas para uma grande variedade de polissacarídeos (VON POSER, 2001).

Certas propriedades apresentadas por vários polissacarídeos são importantes para explicar determinadas respostas fisiológicas provocadas por estas substâncias. Entre elas estão a capacidade de retenção hídrica e a adsorção de moléculas orgânicas. A primeira é muito relevante e advém da presença de açúcares com grupamentos polares livres. A hidratação das moléculas resulta na formação de uma matriz gelatinosa, o que pode conduzir a uma maior viscosidade do conteúdo do intestino delgado e, apresentar, então, efeitos críticos na absorção de substâncias. Além disso, os ácidos biliares, o colesterol e alguns compostos tóxicos são adsorvidos por determinados polissacarídeos. Ainda que esta propriedade não tenha sido estudada adequadamente, a capacidade desses polissacarídeos em captar/adsorver potenciais agentes carcinogênicos tem sido proposta em um dos mecanismos protetores contra o câncer de cólon e reto (INNAMI *et al*, 2000; VON POSER, 2001; SLAVIN & GREENBERG, 2003).

Alguns polissacarídeos, como a xantana, são denominados de “fibras alimentares”. Basicamente, fibras alimentares são polissacarídeos resistentes à digestão pelas enzimas do trato gastrointestinal humano e que apresentam algum efeito laxativo (VON POSER, 2001; SLAVIN & GREENBERG, 2003).

Além disso, a xantana tem sido estudada como possível ingrediente de “alimentos funcionais” por indicar capacidade em reduzir o índice de colesterol no plasma sanguíneo e, conseqüentemente, diminuir o risco de doenças cardiovasculares (MISAKI, 1992; CASTRO *et al*, 2003). Vários estudos têm mostrado esta associação entre ingestão de polissacarídeos e a redução de doenças cardíacas. O mecanismo principal discutido inclui a interferência na absorção e metabolismo dos lipídeos, prejudicando a absorção do colesterol (FRIAS & SGARBIERI, 1998; GRIZARD *et al*, 2001; CASTRO *et al*, 2003; SOH *et al*, 2003). Possivelmente pelo mesmo mecanismo que uma dieta rica em fibras, como as que compõem a xantana, pode proteger contra câncer coloretal: pela absorção dos carcinógenos e posterior expulsão pelo trato digestivo, diminuindo a exposição do epitélio do cólon à ação dos mesmos (FERGUSON *et al*, 1993).

Muitos trabalhos também têm relatado a função de uma dieta rica em fibras, como as que compõem a xantana, na diminuição dos índices de glucose no sangue. Os resultados mostram que as fibras diminuem este índice, basicamente, por três mecanismos: primeiro, dieta com fibras aumenta a viscosidade do suco produzido no intestino delgado e impede a difusão da glucose; segundo, elas se ligam a glucose e

diminuem sua concentração disponível no intestino delgado; e, terceiro, retarda a ação da alfa-amilase através da encapsulação do amido e da enzima ou pode inibir diretamente a enzima (OU *et al*, 1985).

No entanto, os polissacarídeos não são desprovidos de efeitos adversos. Tais efeitos manifestam-se, de modo geral, como distúrbios no trato gastrointestinal, principalmente dores abdominais, náuseas e flatulência, provocadas pelos produtos da degradação microbiana dos polissacarídeos. Estes efeitos, apesar de transitórios, desaparecendo à medida que o tratamento prossegue, podem fazer com que a terapia seja interrompida ou que a quantidade administrada de polissacarídeo seja reduzida, em virtude da intensidade dos mesmos (VON POSER, 2001).

A capacidade desses polissacarídeos em trocar íons, além de importante para explicar a teoria de ligação aos ácidos biliares, que promove seu efeito hipocolesterolemizante, pode também estar relacionada à reduzida biodisponibilidade de alguns minerais, tais como, zinco, ferro e cálcio e, à diminuição da absorção de alguns eletrólitos, conduzindo à elevada excreção fecal desses compostos. Vitaminas, tais como o ácido ascórbico (vitamina C) e a cianocobalamina (vitamina B₁₂), podem ter sua absorção prejudicada de forma considerável (VON POSER, 2001). Em determinados casos onde a ingestão de polissacarídeos é elevada, pode ocorrer um aumento de danos ao DNA pela deficiência de determinados micronutrientes (ODIN, 1997; FENECH & FERGUSON, 2001), como vitaminas e minerais, cuja absorção é diminuída em função da viscosidade destes polissacarídeos, dificultando a absorção e o metabolismo de várias substâncias (CASTRO *et al*, 2003; SLAVIN & GREENBERG, 2003). A propriedade dos polissacarídeos de modular a resposta glicêmica pode provocar, em indivíduos não-diabéticos, hipoglicemia. A absorção de proteínas pode, também, ser prejudicada. O uso de modo indevido de polissacarídeos que formam dispersões viscosas, como a xantana, em dosagem acima daquela recomendada, pode originar obstruções esofágica, gástrica ou do intestino delgado (VON POSER, 2001).

2.3 Agentes Genotóxicos e Danos Genéticos

Muitos compostos capazes de causar mutações gênicas também causam mutações cromossômicas, no entanto algumas substâncias mutagênicas atuam apenas em nível cromossômico, sendo imprescindível à utilização dos testes

citogenéticos na avaliação do potencial mutagênico de um composto. O dano ao material genético pode ser avaliado nos tecidos somáticos (dano ao próprio indivíduo, em curto prazo) e nas células germinativas (danos às gerações futuras, em longo prazo) (RABELLO-GAY *et al*, 1991).

As mutações podem afetar desde um único par de bases do DNA, causando uma mutação de ponto (por adição, substituição ou deleção de bases); até uma sequência de bases, originando uma mutação gênica; ou então, atingir vários genes gerando uma mutação cromossômica (ZAHA, 1996). Estes efeitos são uma consequência direta de reações entre produtos químicos e o DNA dos organismos (ANDERSON, 1995). São detectados dois tipos de substâncias que geram aberrações cromossômicas: as que produzem aberrações cromossômicas estruturais – substâncias clastogênicas – e as que interferem na formação do fuso mitótico, provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante a divisão celular e causando aneuploidias (aberrações numéricas) (RABELLO-GAY *et al*, 1991).

A indução de dano genético por agentes genotóxicos é um processo que se realiza em várias etapas. Durante o processo, o agente xenobiótico ingressa no organismo, é absorvido, distribuído e atravessa as membranas. Uma vez dentro da célula, o agente químico pode ser reativo por si só (ação direta), ou pode ser ativado pelas enzimas metabólicas (ação indireta), sendo chamado de agente promutagênico. Desta forma, ocorre a interação com o DNA; esta alteração pode ser reparada eficientemente ou não. Em caso negativo, o dano genético inicial pode se fixar, expressando-se nos diferentes tipos celulares e, caso atinja as células germinativas, será passado às gerações seguintes (ARNAIZ, 1997).

A indução e a resposta dos organismos às substâncias genotóxicas depende de vários fatores, sendo que os mais importantes são as propriedades específicas, físicas e químicas do composto, e o tempo e nível de exposição (SÖDERKVIST & AXELSON, 1995; ARNAIZ, 1997).

Outros fatores, além das substâncias conhecidamente genotóxicas, também podem causar danos no DNA, como por exemplo, a carência de determinadas vitaminas e minerais que podem levar a quebras e lesões oxidativas. Portanto, uma dieta equilibrada de micronutrientes pode contribuir com a estabilidade genômica (FRANKE *et al*, 2005a). Segundo Franke e colaboradores (2005b), deficiência de vitaminas na dieta humana são geralmente ligadas a danos no DNA. A vitamina C

(ácido ascórbico), encontrada em vegetais e frutas frescas, é um importante micronutriente, que vem sendo estudado pela sua ação protetora contra diferentes doenças e pela sua habilidade em interagir, direta ou indiretamente, com mutágenos. O mecanismo pelo qual o ácido ascórbico age inclui atividades bio-antimutagênica e desmutagênica, pois ele compete com o DNA como alvo para alquilação, reduzindo a genotoxicidade dos agentes alquilantes (FRANKE *et al*, 2005 a; FRANKE *et al*, 2005b). Vários tipos de alimentos contêm componentes muito prejudiciais à saúde, sendo que vários deles são conhecidos por causarem danos específicos ao DNA celular sob certas condições (BURDON, 1999). Como por exemplo, alguns metais (Cu e Fe), altas concentrações de vitaminas e cafeína, entre outros (ODIN, 1997; FRANKE *et al*, 2005a).

2.4 Fatores de Risco

Além dos fatores genéticos, os organismos estão diariamente expostos a diferentes quantidades e tipos de fatores de risco ambientais, que somados aos genéticos, poderão levar ao desenvolvimento de diferentes tipos de tumores. Desta forma, cada organismo apresentará diferentes mecanismos de defesa, seja contra hábitos nocivos adquiridos ao longo da vida, ou contra fatores de risco encontrados no ambiente de trabalho. Portanto, torna-se importante avaliar quais os fatores que contribuem significativamente na variação encontrada entre os indivíduos estudados (FENECH, 1993).

Embora os fatores ambientais possam ser significativos no processo de carcinogênese, aspectos endógenos como o envelhecimento, também são importantes. Ao longo da vida, o DNA dos mamíferos vai acumulando lesões oriundas de danos oxidativos e mutações. Em humanos, a taxa de mutações somáticas em linfócitos é muito maior em adultos do que em recém nascidos, isso porque a habilidade em reparar os danos do DNA também se reduz com o avanço da idade (BURDON, 1999).

Além do fator idade, de acordo com o “Grupo de Estudo Colaborativo para o Teste de Micronúcleos”, também pode haver diferença na frequência de micronúcleos entre os sexos. Em camundongos, testes feitos com diferentes drogas demonstraram que dependendo do mecanismo de interação das mesmas com o

organismo, elas se comportam de diferentes maneiras de acordo com o sexo (MALUF, 1994).

2.5 Métodos de Avaliação Genotóxica

Os agentes químicos e físicos que causam mutações são identificados através de testes de mutagenicidade ou de genotoxicidade. Atualmente existe uma ampla variedade de testes, sendo que o organismo de prova varia desde bactérias (Teste de Ames), fungos (Teste de Levedura), plantas (Teste com *Allium cepa*), insetos (Teste com *Drosophila melanogaster*), até mamíferos (Teste com Linfócitos e Teste de Micronúcleos), inclusive o homem (HOEBEE & STOPPELAAR, 1996).

Testes de mutagenicidade, incluindo monitoramento citogenético em populações humanas e animais, são de máxima importância para o conhecimento e redução de riscos genotóxicos para o ambos (HOEBEE & STOPPELAAR, 1996; ZUCCHI *et al*, 2004). Alternativamente métodos mais simples e rápidos podem ser realizados.

2.5.1 Ensaio Cometa

Na década de 70, Peter Cook e colaboradores desenvolveram uma forma de investigar a estrutura nuclear baseado na lise das células com detergentes não-iônicos e com alta concentração de cloreto de sódio, este tratamento removia membranas, citoplasma e outras estruturas, deixando somente o nucleóide, composto por uma matriz de RNA e proteínas e, DNA. Esta técnica, ao longo dos anos, foi sendo modificada e adaptada por vários pesquisadores, até que Östling & Johanson observaram os primeiros “cometas” em 1984 (embora eles não utilizassem esta denominação) (COLLINS, 2004). Muitas pesquisas e adaptações vêm sendo realizadas até o momento por diversos grupos independentes (SINGH *et al*, 1988; OLIVE *et al*, 1990; ROJAS *et al*, 1999; TICE *et al*, 2000; COLLINS, 2004).

O ensaio cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Este ensaio não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em

mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção (RIBEIRO *et al*, 2003).

A medida das quebras das fitas de DNA feitas através do *Single Cell Gel Eletrophoresis* (SCGE), ou teste cometa, pode avaliar a eficiência dos agentes genotóxicos. O teste cometa é um método sensível e rápido para a detecção de quebras nas fitas do DNA, em células individualizadas. Seu uso tem aumentado significativamente nos últimos anos (SINGH *et al*, 1988; FAIRBAIN *et al*, 1995).

O método consiste, basicamente, em poucas células suspensas em uma fina camada de gel de agarose numa lâmina de microscópio que são lisadas, submetidas à eletroforese e coradas com uma substância (fluorescente ou não) que se liga ao DNA. A corrente elétrica empurra o DNA para fora do núcleo de tal modo que o DNA relaxado, quebrado, ou não, migra no gel em direção ao pólo oposto, sendo que os fragmentos menores migram mais rapidamente. As imagens resultantes que, pela aparência, denominam-se “cometa”, são avaliadas para se determinar os danos ao DNA. O método para a medida das quebras na fita do DNA geralmente é baseado no fato de que estes agentes reduzem bastante o tamanho da molécula. Valores elevados de pH (>13) são usados para facilitar a desnaturação, o desenrolamento e a expressão das quebras do DNA, fita simples ou dupla, pois as quebras só se tornam aparentes depois da exposição a álcalis (lesões álcali-lábeis) (ROJAS *et al*, 1999; ZUCCHI *et al*, 2004).

O potencial para causar danos ao DNA, pode ser avaliado rapidamente, pois há uma rápida detecção dos danos imediatamente após a injúria ao DNA, sem qualquer necessidade de se esperar pela progressão das mitoses, e o teste cometa pode ser considerado como um biomarcador de genotoxicidade, para animais e plantas (ZUCCHI *et al*, 2004).

2.5.2 Teste de Micronúcleos

O teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial. O procedimento original para o teste de micronúcleos foi desenvolvido por Schmid e

colaboradores e, subsequente, modificado por Heddle e colaboradores, que também estabeleceram a origem do micronúcleo (RIBEIRO *et al*, 2003).

As características básicas do teste são (1) o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos¹ anucleados (PCE); (2) o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente; (3) os micronúcleos são facilmente identificáveis e a sua distribuição é bem definida; e (4) a frequência de micronúcleo induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem (RIBEIRO *et al*, 2003).

No laboratório, o material de amostragem é preparado e o resultado analisado no microscópio, podendo ser estocado para uso futuro, meses ou anos depois da data da coleta (MOORE *et al*, 1996).

Os micronúcleos (MN) – um ou mais por célula - aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos acêntricos que resultam de quebras, podem não ser incorporados ao núcleo principal das células filhas após a mitose, pois se atrasam, em relação aos demais, em sua migração para os pólos do fuso na anáfase, sendo excluídos do novo núcleo formado na telófase. Os MN podem, também, ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno (micro) núcleo, redondo ou oval, contendo DNA sem qualquer conexão estrutural com o núcleo principal e com as mesmas propriedades de coloração deste (RABELLO-GAY *et al*, 1991; PEACE & SUCOP, 1999; RIBEIRO *et al*, 2003). Os resultados positivos com teste de MN fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada. Sob condições experimentais apropriadas, os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica (RIBEIRO *et al*, 2003).

¹ Eritrócito policromático é um eritrócito em estágio intermediário de desenvolvimento que ainda contém ribossomos e, portanto, pode ser distinguido do eritrócito maduro (NCE), pela coloração seletiva para ribossomos ou RNA.

2.6 Legislação de Aditivos Alimentares

Em todos os países, a produção de alimentos e seus aditivos devem, obrigatoriamente, seguir a legislação alimentar, adequando-se aos órgãos nacionais e internacionais.

A World of Health Organization (WHO) tem se comprometido em melhorar a qualidade da nutrição e, identificar e eliminar qualquer aditivo ou ingrediente alimentar caso seu uso contínuo apresente qualquer efeito nocivo à saúde humana, através da criação de um programa de regulamentação da segurança em alimentos (ANDERSON, 1995).

Com isso, as legislações alimentares têm adotado, atualmente, os seguintes critérios gerais para aprovação de aditivos alimentares:

1. Aditivos alimentares podem ser aprovados somente se: (a) for demonstrada uma necessidade tecnológica racional a qual não pode ser alcançada por outros meios economicamente e tecnologicamente praticáveis, (b) não apresentem risco a saúde do consumidor ao nível do uso proposto, e (c) que não enganem o consumidor;
2. Determinar os possíveis efeitos nocivos de um aditivo alimentar, ou derivados dele, através da avaliação por testes toxicológicos apropriados;
3. Todos os aditivos devem ser continuamente observados e também reavaliados quando necessário, assim que houver modificação das condições de uso e novas informações científicas.

De acordo com o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), uma grande variedade de testes *in vivo* e *in vitro* pode ser usada para avaliar a segurança de aditivos alimentares; entre eles, estão os testes rápidos de mutagenicidade que envolvem o uso de bactérias, leveduras, fungos e diversos tipos de células de mamíferos, como por exemplo, micronúcleos (ANDERSON, 1995). Este comitê, formado por pessoas especializadas, reconheceu e estabeleceu vários protocolos para identificar as propriedades, estrutura, composição e função dos produtos testados. Com relação aos critérios de identificação e pureza, há algumas considerações para gomas derivadas de fermentação microbiana (por exemplo, xantana e dextrana), tais como informações adicionais sobre peso molecular,

especificações microbiológicas e também detalhes dos possíveis componentes peptídicos (ANDERSON, 1995).

A ANVISA, no Art 8º do Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961 que dispõe sobre Normas Técnicas Especiais Reguladoras do Emprego de Aditivos Químicos a Alimentos, consta que é proibido o uso de aditivo em alimentos quando, entre outros, houver evidência ou suspeita de que o mesmo possui toxicidade atual ou potencial.

No entanto, a Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999 (ANVISA), que aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos, o qual se aplica aos alimentos e ingredientes para consumo humano, dispõe que a comprovação de segurança será conduzida com base em informações de finalidade e condições de uso do alimento ou ingrediente; avaliação de risco fundamentada, conforme o caso, em uma ou mais evidências científicas. Além disso, nesta mesma Resolução, constam as evidências científicas aplicáveis, conforme o caso, à comprovação de uso. Entre elas estão:

- ? Composição química com caracterização molecular, quando for o caso, e ou formulação do produto;
- ? Ensaios bioquímicos;
- ? Ensaios nutricionais e ou fisiológicos e ou toxicológicos em animais de experimentação;
- ? Estudos epidemiológicos;
- ? Ensaios clínicos;
- ? Evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecida sobre as características do alimento ou ingrediente;
- ? Comprovação de uso tradicional observado na população, sem associação de danos à saúde humana.

O Conselho Nacional de Saúde por meio da Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988, no uso das atribuições que lhe confere o Decreto nº

93.933, de 14/01/87, e de acordo com o disposto nos artigos 24 e 66 do Decreto-Lei n.º 986, de 21 de outubro de 1969, e no decreto n.º 55.871, de 26 de março de 1965, sobre aprovação da revisão das Tabelas I (ANEXO A), III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto n.º 55.871, de 26 de março de 1995. Determina os aditivos alimentares e os alimentos em que podem ser adicionados e seus limites máximos.

A goma xantana (E.P. XIII), que é considerada um aditivo intencional, pode ser adicionada em:

- ? Produtos de cereais, frutas, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo *petit-suisse* e similares na quantidade de 0,50 p.s.c.;
- ? Queijos cremosos 0,50;
- ? Recheios e coberturas de produtos de confeitaria 0,15;
- ? Sobremesas e pós para sobremesas de flans, pudins e similares 0,20;
- ? Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas 0,50;
- ? Coberturas para saladas 0,50;
- ? Gelados comestíveis 1,00;
- ? Geléia de mocotó 0,50;
- ? Leite aromatizado 0,50; Leite evaporado 0,15; Leite gelificado 0,50;
- ? Molhos ou líquidos gordurosos de cobertura para hortaliças em conservas 1,00;
- ? Produtos de confeitaria 1,00; e,
- ? Pós para cobertura de bolos 0,50 p.s.c.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Xantana

A xantana comercial utilizada, produzida pela Jungbunzlauer (Áustria), normalmente oriunda da cepa NRRL B-1459, foi obtida em estabelecimentos comerciais.

As xantanas sintetizadas pelas cepas do patovar pruni foram produzidas no laboratório de Biopolímeros do Centro de Biotecnologia da UFPel (Fig. 1). O biopolímero obtido da cepa 06 foi produzido por Moreira (2002), durante seu trabalho de Doutorado, enquanto que o sintetizado pela cepa 24 foi produzido por Diaz (2002), em seu trabalho de Mestrado.

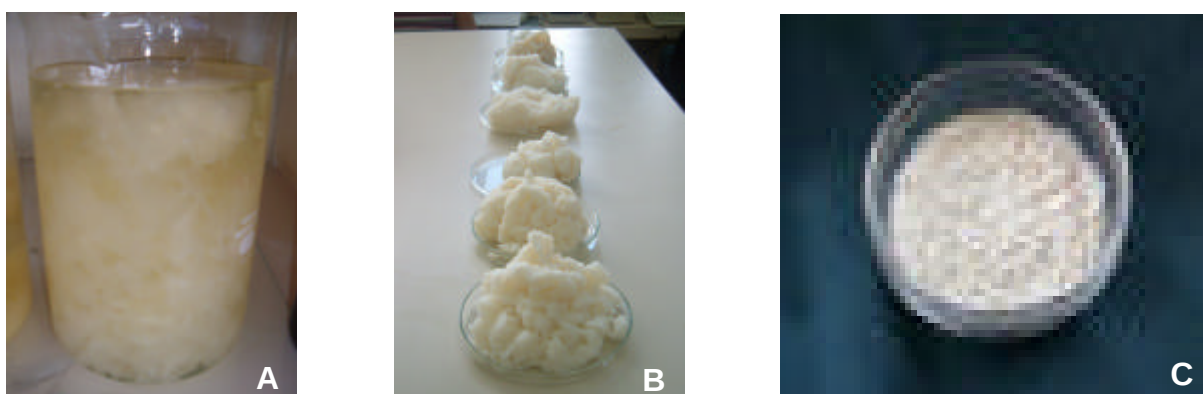


Figura 1. Precipitação (A), recuperação (B) e secagem (C) do polímero. Fonte: Autor.

3.2 Animais e Dosagem

Os animais utilizados foram camundongos da linhagem Swiss-Webster, de 4 a 8 semanas de idade, 20 a 40g de massa corporal, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil. Estes animais foram aclimatados às condições laboratoriais por 7 dias. A temperatura média da sala de experimentação ficou em torno de 24°C e a umidade relativa de aproximadamente 60%. O ciclo de luz foi de 12h luz/12h sombra como descrito por Majerowicz (2004) e por Da Silva e seus colaboradores (2002). Todos os animais receberam ração comercial (Supra; Alisul Alimentos S/A) e água *ad libidum*. Os animais foram acondicionados nas gaiolas (Fig. 2) em pequenos grupos do mesmo sexo e identificados individualmente (Fig. 3). Foram separados grupos controle e teste (4 machos e 4 fêmeas). Os grupos receberam as xantanas 1, 2 e 3 (cepa 06, 24 e comercial, respectivamente), por gavagem, em uma solução aquosa a 1% (m/v), e a dose foi de acordo com a massa corpórea de cada animal (0,1g/kg). Todas as doses foram repetidas após 24 e 48h. Os animais de todos os grupos foram observados durante 72h e, posteriormente, sacrificados por deslocamento cervical 24h após a última dose.



Figura 2 Acondicionamento dos camundongos em gaiolas de polipropileno. Fonte: Autor.



Figura 3 Acondicionamento dos camundongos em pequenos grupos do mesmo sexo e identificados individualmente com Ácido Pícrico (seta). Fonte: Autor.

3.3 Single Cell Gel Eletrophoresis (SCGE) – Ensaio Cometa

O SGCE foi realizado como descrito por Singh *et al* (1988) e modificado de acordo com Da Silva *et al* (2002) e Rojas *et al*, (1999). Neste ensaio, o mesmo grupo de roedores foi utilizado para o teste de micronúcleos, sendo 8 camundongos (4 machos e 4 fêmeas) para cada grupo teste. No entanto, para os grupos controles (positivo e negativo) foi utilizado sangue humano. De acordo com o descrito por Da Silva e seus colaboradores (2002), foi utilizado como controle positivo metanosulfonato (MMS; Sigma) na concentração de 80mg/kg. Os grupos foram tratados no mesmo dia, as demais doses foram ministradas 24 e 48 horas após a primeira e todos os animais tiveram o sangue coletado 24h após a última dose.

A preparação das lâminas, lise e eletroforese foram conduzidas sob luz vermelha para prevenir maiores danos ao DNA (Fig. 4). Amostras de sangue foram coletadas e processadas de acordo com Rojas e seus colaboradores (1999) (ANEXO B) com adaptações feitas pelo autor para este trabalho. Resumidamente, as células foram misturadas com agarose *low melting* 0,5% a 37°C e adicionadas à lâmina previamente refrigerada pré-coberta com agarose *normal melting* 0,65%.

Após a preparação das lâminas, estas foram adicionadas em solução de lise (EDTA 100mM, NaCl 2,5M, Tris 10mM – pH10, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO) por 24 horas, então, imersas em solução tampão alcalina (NaOH 300mM; EDTA 1mM) para a eletroforese, com período de *unwinding* de 20min. Após este período foi realizada a eletroforese a 25V e 300mA por 15min. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com a solução de neutralização (Tris 0,4M; HCl 10N; pH 7,5) 3 x 5min, e então, coradas com brometo de etídeo.

Assim como descrito por Heuser e colaboradores (2002), as lâminas foram analisadas logo após a coloração em microscópio de fluorescência, equipado com um filtro de excitação de BP546/12nm e um filtro de 590nm, com aumento de 400X (10X + 40X). De acordo com o trabalho de Collins e seus colaboradores (1995), foram analisadas 100 células por animal (50 células/lâmina) e estas foram classificadas visualmente dentro de 5 classes (Figura 5A a 5D; Fig. 6A e 6B) de acordo com o tamanho da cauda, desde sem cauda – 0, a cauda máxima – 4, resultando em um *score* de danos simples para cada animal e, conseqüentemente, para cada grupo estudado. Portanto, o índice de dano (ID) do grupo poderá ser de 0 (todas as células sem cauda - 0 x 100) a 400 (todas com tamanho máximo da cauda – 4 x 100).

A frequência de dano observada foi calculada, de acordo com Heuser e seus colaboradores (2002), com base no número de células danificadas vs. àquelas sem danos, num total de 100 células.



Figura 4 Preparação das lâminas, lise e eletroforese sob as condições indicadas para evitar danos ao DNA (sob luz vermelha). Fonte: Autor.

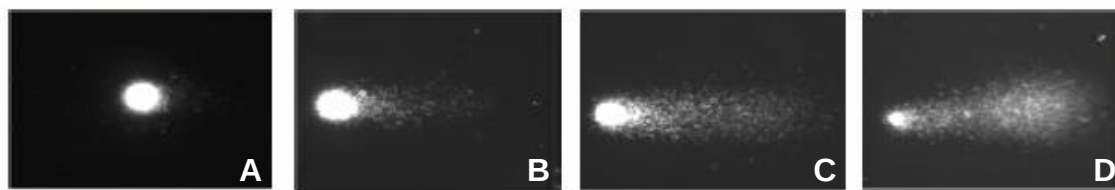


Figura 5. (A, B, C e D) Imagens de várias classes de danos no DNA (cometas).
Fonte: LABORATORY IMAGING, 2003.

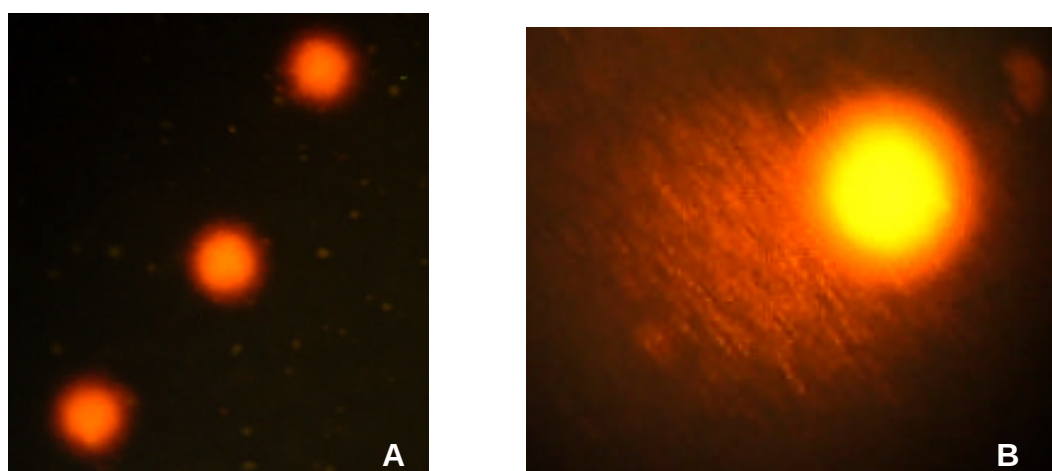


Figura 6 (A e B) Fotografias de cometas observados durante o experimento. Fonte Autor.

3.4 Teste de Micronúcleos

Os testes foram realizados de acordo com o descrito pela Environmental Protection Agency Gene-Tox Program - EUA (MAVOURNIN *et al*, 1990; MILLER *et al*, 1997). Foram utilizados oito camundongos por grupo (4 machos e 4 fêmeas). A dosagem utilizada foi de 0,1mL/10g de massa corporal com uma solução aquosa a 1% (m/v) de cada xantana. Segundo a metodologia descrita em Da Silva *et al* (2002); junto aos grupos teste foram utilizados grupos controle negativo (dosados com veículo) e positivo (dosados com 2 X 25mg/kg de ciclofosfamida). Todas as doses foram repetidas após 24h, os animais foram sacrificados 24h após a última dose. A medula óssea dos animais foi preparada usando soro fetal bovino e os dois fêmures de cada indivíduo. Primeiramente, as lâminas foram fixadas em metanol 100% por 10min, depois pré-coradas numa solução com 5% de Giemsa em Tampão

fosfato (pH 5,8) por 10min. Após a coloração as lâminas foram molhadas rapidamente com água destilada, secas e guardadas até a coloração definitiva com uma solução com 20 % de Giemsa em tampão fosfato (pH 5,4) por 2 min e numa solução com 20% de Giemsa e 20% de May-Greenwald em água destilada. Posteriormente, as lâminas foram lavadas rapidamente com água destilada, secas e guardadas até à análise (análise “cega”).

A taxa espontânea de eritrócitos policromáticos com micronúcleos (Fig. 7) é baixa e consistente cerca de 3 por 1000. Por isso, a contagem de micronúcleos foi feita em 1000-2000 eritrócitos policromáticos por animal. A percentagem de EPC entre o total de eritrócitos (proporção EPC:ENC) também foi analisada a fim de se avaliar a citotoxicidade na medula óssea. A toxicidade é indicada por uma redução significativa na percentagem de EPC (eritrócitos jovens), e é determinada pela análise de pelo menos 1000 eritrócitos por animal (RIBEIRO *et al*, 2003). De acordo com Rabello-Gay e seus colaboradores (1991), nos controles e após os tratamentos que não afetam a proliferação da medula, a relação entre policromáticos e normocromáticos é aproximadamente 1:1. A análise de 2000 eritrócitos reduz o número de decisões subjetivas. Quando a proliferação normal das células da medula estiver prejudicada a contagem deve ser restrita à população policromáticos, pois nestas circunstâncias a medula é invadida por sangue periférico e a relação 1:1 é distorcida em favor das células vermelhas maduras (ENC).

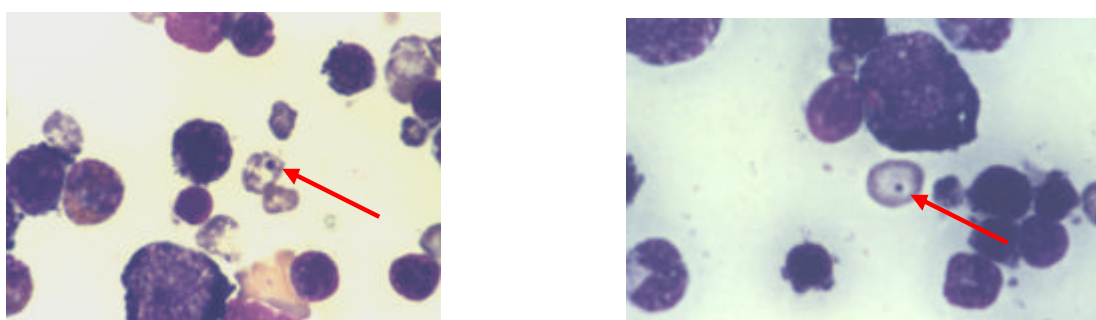


FIGURA 7. Fotografia de eritrócitos micronucleados (setas), observados durante o experimento. Fonte: Autor.

3.5 Glicose e Colesterol

Os índices de colesterol total e glicose foram determinados através de testes enzimáticos usando kits comerciais (Colesterol e Glicose PAP, respectivamente) da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A – Minas Gerais, Brasil). As amostras de sangue foram coletadas antes e depois do tratamento com xantana.

3.6 Análise Estatística

Para os dados que apresentaram distribuição normal ou (Gaussiana), como ID e FD (ensaio cometa), foi utilizado o teste ANOVA –Tukey para comparações múltiplas, e teste t para comparação entre os sexos dentro do mesmo grupo.

A análise estatística para a frequência de EPC micronucleados e para Proporção EPC:ENC foi realizada comparando os grupos-teste (xantanas) com os grupos controle para cada tratamento usando o teste de Mann-Whitney. Uma diferença de $P < 0,05$ foi considerada significativa.

A diferença nos índices de glicose e colesterol, obtidos antes e depois dos tratamentos com xantana, foi testada utilizando o teste t para amostras pareadas. Uma diferença de $P < 0,05$ foi considerada significativa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A xantana produzida comercialmente foi amplamente estudada quanto a sua toxicidade. No entanto, as xantanas produzidas pelo patovar pruni, que diferem da comercial na sua composição, ainda não foram estudadas genotoxicamente, por isso diversos trabalhos devem ser conduzidos para investigar sua capacidade em produzir danos genéticos. A seguir serão mostrados os resultados obtidos para tais polímeros, com a realização do ensaio cometa e teste de micronúcleos em camundongos, com intuito de colaborar com esta investigação, bem como análises de colesterol e glicose para verificar se as xantanas interferem nos níveis desses compostos.

As xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24, bem como a xantana comercial, utilizadas neste experimento foram caracterizadas por Moreira (2002) e Moreira & Diaz (dados não publicados). A xantana comercial é composta por glicose, manose e ácido glicurônico e, as xantanas produzidas pelo pv pruni são compostas por glicose, manose, ácido glicurônico e ramnose. Quanto à composição química, o polissacarídeo da cepa 24, demonstrou possuir maior teor de glicose, enquanto que o da cepa 06 apresentou um expressivo conteúdo de ramnose, estando este ausente na xantana comercial.

Todas as xantanas utilizadas neste experimento demonstraram o mesmo comportamento reológico, pseudoplástico, e suas viscosidades são equivalentes. Nas taxas de deformação de $10s^{-1}$ e $30s^{-1}$, as soluções aquosas a 1% (m/V) dos polímeros das cepas 06, 24 e comercial, apresentaram respectivamente os

seguintes valores: 700 mPas e 310 mPas, 750 mPas e 300 mPas, 850 mPas e 400 mPas.

Todas as xantanas utilizadas possuem solubilidade em água quente e fria, estabilidade frente à temperatura entre 25 e 85°C, ampla faixa iônica e pH.

Os resultados do ensaio cometa, sobre o Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD), para cada tratamento e por sexo, estão representados na Tabela 1.

Comparações usando o teste de Tukey (ANOVA) entre as médias de ID e FD dos grupos, não apresentaram diferenças significativas entre os sexos para os tratamentos com xantana; além disso, não houve diferença entre as fêmeas e, também, entre os machos dos tratamentos com xantana. O ID e a FD observados nos tratamentos demonstrou que todos os grupos foram significativamente inferiores ao controle positivo ($P < 0,001$) e não diferiram estatisticamente em relação ao controle negativo.

TABELA 1 Índice e Frequência de Dano (ID e FD, respectivamente) do DNA das células sanguíneas de camundongos tratados com as xantanas 1, 2 e 3 (cepas 06, 24 e comercial, respectivamente).

Grupo	ID (Geral)	ID Machos	ID Fêmeas	FD (Geral)*	FD machos*	FD Fêmeas*
Controle -	5,0 ? 2,45	7,0 ? 1,41	3,0 ? 0	5,0 ? 2,45	7,0 ? 1,41	3,0 ? 0
Xantana 1	6,13 ? 4,32	8,75 ? 4,86	3,5 ? 1,29	5,25 ? 3,2	7,5 ? 3,11	3,0 ? 0,82
Xantana 2	4,3 ? 1,83	4,25 ? 2,36	4,25 ? 1,5	4,13 ? 1,73	4,0 ? 2,16	4,25 ? 1,5
Xantana 3	5,88 ? 3,23	7,0 ? 3,16	4,75 ? 3,3	5,63 ? 2,83	7,0 ? 3,16	4,25 ? 1,89
Controle +	64,25 ? 5,8**	68 ? 5,66**	60,5 ? 3,54**	31,0 ? 5,72**	35,5 ? 3,54**	26,5 ? 2,2**

* valores são médias calculadas em 100 células por animal;

** $P < 0,001$ em relação ao controle positivo.

Os resultados do teste de micronúcleos sobre o número de eritrócitos micronucleados e a proporção EPC:ENC estão demonstrados na Tabela 2.

Não houve diferença significativa tanto para o número de eritrócitos micronucleados quanto para a proporção EPC:ENC entre os sexos nos grupos X1, X2 e X3. No entanto, o grupo controle negativo apresentou diferença entre os sexos para ambas análises, de acordo com o teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Quanto à presença de eritrócitos micronucleados nenhum dos grupos apresentou contagem significativamente diferente do controle negativo, com exceção das fêmeas do controle negativo que tiveram índice de MN significativamente maior que o das fêmeas dos grupos X2 e X3 ($P < 0,01$).

Com relação à proporção EPC:ENC, as fêmeas dos grupos X1 e X2 apresentaram índice superior ao das fêmeas do grupo controle negativo ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente). No entanto, os machos do grupo X2 apresentaram índice significativamente inferior aos machos do controle negativo ($P < 0,05$).

TABELA 2 Média e o desvio padrão de eritrócitos policromáticos micronucleados da medula óssea de camundongos tratados com as xantanas 1, 2, 3 (cepas 06, 24 e comercial, respectivamente) e controle negativo.

Grupo	Sexo	n	Eritrócitos MN		Proporção EPC:ENC		
			Por sexo	Por grupo	Por sexo	n	Por grupo
Controle	M	4	0,50 ± 0,41	1,06 ± 0,78	10,81±2,80*	8	6,78±4,68
	F	4	1,63 ± 0,63		2,76±0,51		
Xantana 1	M	4	0,63 ± 1,25	0,63 ± 0,92	5,56±1,24	8	6,23±2,47
	F	4	0,63 ± 0,63		6,89±3,4 ^a		
Xantana 2	M	4	0,50 ± 0	0,31 ± 0,26	5,18±1,97 ^b	8	5,37±1,8
	F	4	0,13 ± 0,25 ^d		5,55±1,9 ^c		
Xantana 3	M	4	0,75 ± 0,96	0,44 ± 0,73	12,19±10,27	8	8,24±7,99
	F	4	0,13 ± 0,25 ^d		4,30±1,46		

* $P < 0,05$ em relação às fêmeas do mesmo grupo;

^a $P < 0,01$ em relação às fêmeas do controle negativo;

^b $P < 0,05$ em relação aos machos do controle negativo;

^c $P < 0,05$ em relação às fêmeas do controle negativo;

^d $P < 0,01$ em relação às fêmeas do controle negativo.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para os índices de glicose e colesterol, como mostrado nas Figuras 8 e 9. Embora haja uma tendência em diminuir tais índices nos tratamentos com xantana, com exceção do colesterol no tratamento com X2, como pode ser observado na respectiva figura.

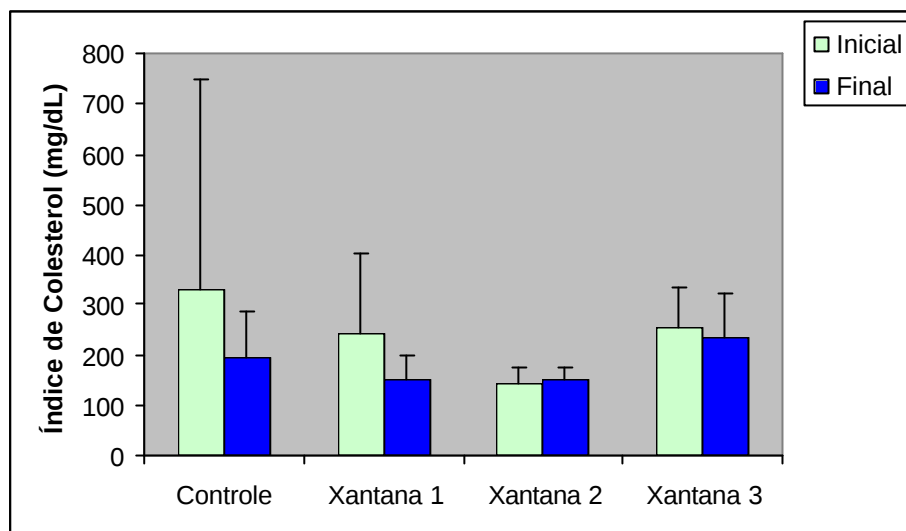


FIGURA 8. Médias obtidas do índice de colesterol no plasma sanguíneo, antes e depois do tratamento com as xantanas; Barras: desvio padrão da amostra.

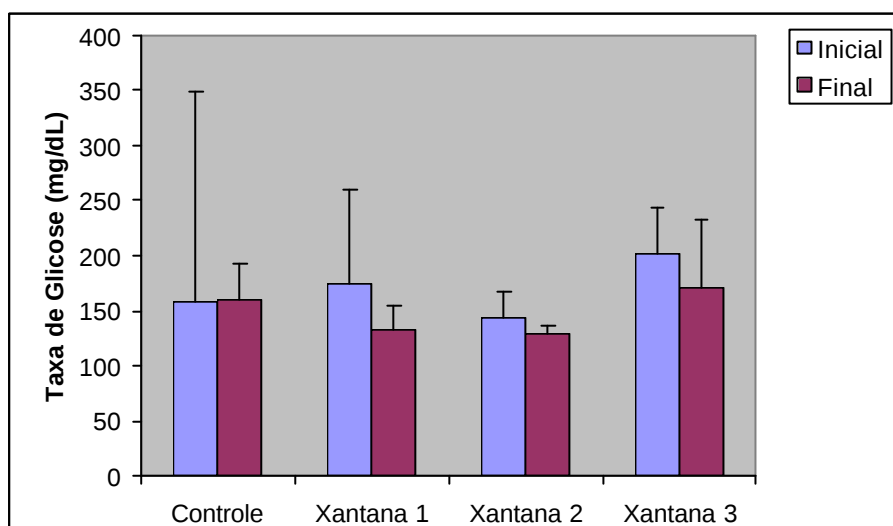


FIGURA 9. Médias obtidas do índice de glicose no plasma sanguíneo, antes e depois do tratamento com as xantanas; Barras: desvio padrão da amostra.

Alguns experimentos com substâncias químicas sintéticas, como os aditivos alimentares produziram lesões no DNA, e desta forma podem ser mutagênicos e/ou carcinogênicos em potencial. Embora os produtos sintéticos sejam mais investigados quanto ao potencial genotóxico/mutagênico, não são por essência mais malignos que as toxinas naturais, pois a forma de ação dos venenos das duas origens é similar e equivalente. Além disso, resultados positivos em experimentos animais devem ser analisados com cautela ao transpor aos humanos, uma vez que o

organismo humano possui suas próprias defesas, e metabolismo diverso (DA SILVA *et al*, 2002).

De acordo com Sasaki *et al* (2002), se um componente mostra resultados negativos *in vitro* (Teste de Ames), normalmente, é suficiente executar um simples ensaio citogenético *in vivo*. Os poucos ensaios *in vivo* que têm sido validados envolvem também a análise de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células da medula óssea ou eritrócitos do sangue periférico. Embora o teste de micronúcleos seja bastante simples, sua função é demonstrar se um componente químico pode alcançar o sistema hematopoiético. No entanto, se um composto mostra resultados positivos *in vitro*, é recomendado que seja realizado um teste *in vivo* usando tecido não hematopoiético. Alguns aditivos são clastogênicos em cultura de células, porém, *in vivo* não. Esta discordância, que pode ser devida ao fato de que testes de genotoxicidade *in vivo* refletem absorção, distribuição, metabolismo e excreção do agente testado, ressalta a importância de tais testes. Embora a maioria dos 39 aditivos alimentares (adoçantes, corantes, conservantes, antioxidantes, fungicidas), estudados pelos autores, serem negativos no Teste de Ames, 14 são clastogênicos em cultura de células. Dados confiáveis sobre testes *in vivo* não estão disponíveis para 9 aditivos que induzem um resultado positivo *in vitro*.

No trabalho de Sasaki e seus colaboradores (2002), os aditivos utilizados que apresentam carcinogenicidade para roedores, pelo teste de micronúcleos, foram também genotóxicos pelo ensaio cometa, sugerindo que este último pode ser utilizado em adição ao teste de micronúcleos. Os resultados para rutina, flavonóide utilizado em medicamentos e, também, como aditivo para alimentos, no estudo de Da Silva e colaboradores (2002), demonstraram aumento de danos no DNA em camundongos, somente pelo ensaio cometa, em uma das doses, o que comprova a sensibilidade deste ensaio. Os resultados obtidos, com o índice e a frequência de dano através do ensaio cometa nesse estudo, demonstraram que as xantanas testadas não induzem danos ao DNA, uma vez que os valores para ambos parâmetros não diferiram significativamente dos valores obtidos no grupo controle negativo.

Considerando que a dose de xantana utilizada neste estudo (1%) ficou no limite máximo permitido (1,0%) para utilização em alimentos, e os resultados obtidos, é improvável que o consumo deste biopolímero produza qualquer efeito genotóxico.

No entanto, deve-se levar em conta que os valores obtidos na frequência de MN foram excepcionalmente baixos, e, portanto, novos testes seriam recomendados.

A avaliação da indução de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea, embora não tão sensível quanto o ensaio cometa, pode ser usado em circunstâncias em que a genotoxicidade é elevada (Da SILVA *et al*, 2002).

Como visto nos resultados, somente o grupo controle negativo apresentou diferença significativa relacionada ao sexo para o teste de micronúcleos, tanto para MN quanto para a proporção EPC:ENC, sendo observado maior índice de MN nas fêmeas. De acordo com Maluf (1994) este fenômeno é comum em camundongos. Este resultado é também foi observado por Mugford & Kedderis (1998) em seu trabalho, onde fêmeas mostraram índices de danos mais altos que os machos, possivelmente devido aos altos níveis do metabolismo xenobiótico, que pode ser resultado dos efeitos hormonais femininos. Além disso, os mesmos autores afirmaram que diferenças sexo-específicas não estão claras, em relação à atuação de substâncias químicas sobre o sexo com baixos índices de metabolismo, podendo causar toxicidade, devido a um prolongamento da meia-vida do químico e às altas concentrações no sangue. Desta forma, se um metabólito tóxico é produto do próprio metabolismo, o sexo com baixa atividade metabólica pode ser menos suscetível à indução da toxicidade químico-específica.

Do mesmo modo que o ensaio cometa, os resultados para o teste de MN demonstraram que as xantanas testadas não aumentam a frequência de eritrócitos micronucleados em células da medula óssea dos camundongos analisados.

Os antimutagênicos são produtos ou processos que reduzem mutações. Algumas vezes são específicos, reduzindo o efeito de determinado produto por interagir com ele. Outras vezes são genéricos, como os “catadores” de radicais livres. Radicais livres são moléculas com excesso ou falta de carga de elétrons. As vitaminas A, C e E, bem como sucos de frutas e extratos vegetais normalmente reduzem a taxa de mutações, na maioria dos experimentos (ODIN, 1997; DA SILVA *et al*, 2002; FRANKE *et al*, 2005a). Apesar do número de indivíduos ser baixo, as fêmeas do tratamento X1 e X3 tiveram valores inferiores para o número de eritrócitos micronucleados ao do controle negativo, o que pode estar indicando um possível potencial antimutagênico. Este potencial antimutagênico pode ser corroborado pela proporção de EPC:ENC, a qual indica se a substância em estudo está causando

morte celular (citotoxicidade) resultando em um falso negativo, com a diminuição da incidência de eritrócitos micronucleados por morte dos mesmos.

Um grande volume de evidências epidemiológicas, associadas a dados obtidos a partir de estudos em animais e *in vitro*, apóia fortemente a estreita correlação entre constituintes da dieta e risco de desenvolvimento de determinados tipos de câncer. Geralmente vegetais e frutas, fibras e certos micronutrientes diminuem a incidência de alguns tipos de câncer. Por outro lado, diferenças entre os indivíduos, incluindo a suscetibilidade genética, também contribuem para a inconsistência dos dados epidemiológicos associados à dieta alimentar e a incidência de cânceres específicos (Da Silva *et al*, 2002). A capacidade dos polissacarídeos em captar/adsorver potenciais agentes carcinogênicos tem sido proposta por vários autores como um dos mecanismos protetores contra o câncer de cólon e reto, juntamente com a propriedade laxativa dos polissacarídeos, a qual diminui o tempo de exposição dos carcinógenos à mucosa intestinal (FERGUSON *et al*, 1993; VON POSER, 2001; GRIZARD *et al*, 2001).

De acordo com vários autores citados por Von Poser (2001), inicialmente, a ação de certos polissacarídeos na prevenção de câncer colo-retal era atribuída à diluição e redução do tempo de permanência de potentes substâncias carcinogênicas no intestino e à diminuição, por degradação bacteriana, da concentração de ácidos biliares, com potencial ação carcinogênica. Mais recentemente, as atenções têm sido direcionadas para a alteração na biodisponibilidade do butirato (AGCC) luminal, que tem importante influência sobre a proliferação dos colonócitos (células do cólon).

Nas últimas décadas, polissacarídeos emergiram como uma importante classe de produtos naturais bioativos. Atividades antitumoral, imunoestimulante, anticomplemento, antiinflamatória, anticoagulante, antiviral, hipoglicêmica e hipocolesterolêmica têm sido relatadas para uma grande variedade de polissacarídeos, incluindo a xantana (VON POSER, 2001) como mostrado no trabalho de Soh e seus colaboradores (2003) que observaram um aumento na adsorção do colesterol total por polissacarídeos de origem microbiana (como xantana) mostrando ser particularmente efetivo como agentes redutores do colesterol. Outro benefício de polissacarídeos à saúde é melhorar a absorção de minerais, embora dietas com fibras tenham sido tradicionalmente relacionadas à diminuição da absorção de minerais. Os polissacarídeos mais solúveis, fontes de

fibras fermentáveis, aparentemente não se ligam a minerais limitando a absorção dos mesmos. Algumas pesquisas têm sustentado a idéia de que esses polissacarídeos podem até melhorar a absorção de minerais (SLAVIN & GREENBERG, 2003).

O efeito hipocolesterolêmico dos polissacarídeos, como referido anteriormente, deve-se à característica de adsorção de moléculas orgânicas que estes apresentam, através da qual os ácidos biliares, colesterol e alguns compostos tóxicos são adsorvidos. A adsorção de ácidos biliares pode ser medida *in vivo* através da capacidade destes compostos em aumentar a excreção fecal destes ácidos e esteróides neutros. Portanto, a habilidade em elevar a excreção dos ácidos biliares pode ser a principal responsável pelo efeito hipocolesterolêmico de certos polissacarídeos (VON POSER, 2001).

Como foi verificado no trabalho de Castro e colaboradores (2003), o volume fecal foi significativamente alto no grupo com xantana em relação aos outros polissacarídeos estudados. Porém, a adição de 1,5% de xantana em uma dieta contendo ácidos graxos não apresentou efeito hipolipidêmico significativo em ratos. No entanto, Levrat-Verny e colaboradores (2000) afirmam que 1% de hidrocolóides na dieta, tais como guar e xantana reduzem significativamente o colesterol.

No presente trabalho, assim como no trabalho de Castro e seus colaboradores (2003), não foi observado efeito hipocolesterolêmico nos camundongos analisados depois da ingestão das xantanas, quando comparados aos respectivos índices iniciais. No entanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar quais concentrações destes polissacarídeos são realmente capazes de reduzir os índices de colesterol.

Além do efeito hipocolesterolêmico, em diversos trabalhos foi observado também, um efeito hipoglicêmico com diminuição de glicose e insulina no plasma e uma melhora significativa nos níveis de glucagon em ratos alimentados com fibras. Estas evidências estão relacionadas à diminuição da absorção de glicose no intestino devido à ingestão de polissacarídeos.

Assim como para o índice de colesterol, o índice de glicose no plasma sanguíneo dos camundongos não apresentou uma diminuição significativa com relação aos valores obtidos anteriormente ao tratamento com as xantanas.

No trabalho de Frias & Sgarbieri (1998), eles observaram que o diabetes elevou os índices de lipídios sanguíneos em todos os animais, supondo, então, que

há uma correlação entre os índices de colesterol e glicose. Esta observação corrobora os resultados obtidos no presente trabalho, onde também se sugere esta correlação nas figuras 8 e 9.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a ausência de genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *X. campestris* pv *pruni* e a xantana comercial, em sangue de camundongos. De um modo geral, o mesmo resultado também foi obtido através do teste de MN em medula óssea. No entanto, além do potencial genotóxico, outras propriedades destes polissacarídeos devem ser estudadas, já que o consumo excessivo destes pode causar efeitos adversos, como comentado no trabalho de Slavin e seu colaborador (2003), e efeitos potencialmente negativos, incluem a absorção reduzida de nutrientes (MALLET *et al*, 1984), tais como vitaminas (principalmente C e B₁₂), minerais como zinco, cálcio e ferro e proteínas (VON POSER, 2001), o que também pode gerar danos no DNA (FRANKE *et al*, 2005a; FRANKE *et al*, 2005b). Além disso, segundo Von Poser (2001), os polissacarídeos interagem com vários fármacos, retardando a absorção dos mesmos. Porém, esta interação pode ser evitada intercalando a ingestão dos medicamentos e dos polissacarídeos.

Além disso, fórmulas enterais enriquecidas com fibras podem obstruir pequenos orifícios do tubo digestivo. Isto é ainda mais problemático com gomas e outras fibras viscosas (SLAVIN & GREENBERG, 2003). Outros efeitos negativos dos polissacarídeos referem-se a distúrbios no trato gastrointestinal, principalmente, dores abdominais, náuseas e flatulência, provocadas pelos produtos de degradação microbiana dos polissacarídeos (VON POSER, 2001).

No entanto, não é comum que adultos saudáveis que consumam fibras dentro das quantidades recomendáveis tenham problemas com absorção de nutrientes, no entanto, essa quantidade não é recomendada para crianças e idosos, porque poucos estudos têm sido realizados nesta faixa etária (SLAVIN & GREENBERG, 2003).

Com tudo isso fica evidente a necessidade de mais estudos, com concentrações maiores de xantana e, também, a avaliação da interação deste polímero com outras substâncias além do colesterol e glicose, como, por exemplo: vitaminas, minerais e fármacos.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos através do ensaio cometa, concluiu-se que:

- ? A xantana comercial oriunda da bactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris* não induziu danos no DNA, extraído de amostras de sangue, dos camundongos observados, nas condições testadas;
- ? As xantanas produzidas pela bactéria *X. campestris* pv *pruni* (cepas 06 e 24) não induziram danos ao DNA, extraído de amostras de sangue, dos camundongos analisados, nas condições testadas.

Em relação aos resultados obtidos através do teste de micronúcleos, concluiu-se que:

- ? A xantana produzida comercialmente não induziu formação de micronúcleos em células da medula óssea dos camundongos, nas condições testadas;
- ? As xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *X. campestris* pv *pruni* não induziram a formação de micronúcleos nas células da medula óssea dos camundongos, nas condições avaliadas.

Nos resultados obtidos através dos testes bioquímicos para medir os índices de colesterol e glicose, concluiu-se que:

- ? As xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *X. campestris* pv *pruni* não induziram efeito hipocolesterolêmico e hipoglicêmico no plasma sanguíneo dos camundongos, sob as condições avaliadas.

Desta forma, os resultados obtidos corroboram a hipótese de que as xantanas produzidas pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv *pruni* não causam danos no DNA ou nos cromossomos das cobaias estudadas, avaliadas através de ensaio cometa e teste de micronúcleos. Além, de não alterar os índices de colesterol e glicose no plasma sanguíneo de camundongos, avaliado por testes bioquímicos. Em virtude disso, é possível inferir que há viabilidade de sua utilização na alimentação humana.

6 REFERÊNCIAS

ANDERSON, D. M. W. Regulatory Aspects. In: Stephen, A. M. **Food Polysaccharides and their Applications**. New York: Ed. Marcel Dekker, 1995, p. 607-632.

ARNAIZ, R.R. **Las Toxinas Ambientales e Sus Efectos Genéticos**. 2ª edição. México:IEPSA, 1997, 95 p.

BASSAN, J. S. **Avaliação da Genotoxicidade Ocupacional de trabalhadores em sapatarias na região de Pelotas-RS**. 2003, 61 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BRASIL. Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961. Dispõe sobre Normas Técnicas Especiais Reguladoras do Emprego de Aditivos Químicos a Alimentos. **D.O.U.** - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de janeiro de 1961.

BRASIL. Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. **D.O.U.** - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 03 de maio de 1999.

BRASIL. Resolução CNS/MS N.º 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, III e VII, todas do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1995. **D.O.U.** – Diário Oficial da União, de 19 de dezembro de 1988.

BURDON, R. H. **Genes and the Environment**. EUA: Taylor & Francis, 1999, 243 p.

CADMUS, M. C; KNUTSON, C. A; LAGODA, A. A; PITTSLEY, J. E; BURTON, K. A. Synthetic media for production, of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology Bioengineering**, n. 20, 1978, p.1003-1014.

CASTRO, I. A; TIRAPEGUI, J; BENEDICTO, M. L. Effects of diet supplementation with three soluble polysaccharides on serum lipids levels of hypercholesterolemic rats. **Food Chemistry**, n. 80, 2003, p.323-330.

COLLINS, A; AIGUO, M; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strands breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, n. 336, 1995, p. 69-77.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, 2004, p. 249-261.

Da SILVA, J; HERRMANN, S.M; HEUSER, V; PERES, W; MARRONI, N. P; GONZÁLEZ-GALLEGO, J; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, n. 40, 2002, p.941-947.

DIAZ, P. S. **Influência dos parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana**. Dissertação (Mestrado em Ciências). UFPel, DCTA, FAEM, 2002, 65f.

FAIRBAIN, D. W; OLIVE, P. L; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, n. 339, 1995, p. 37-59.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, n. 285, 1993, p. 35-44.

FENECH, M. & FERGUSON, L. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. **Mutation Research**, n. 475, 2001, p. 1-6.

FERGUSON, L. R; ROBERTON, A. M; WATSON, M. E; KESTELL, P; HARRIS, P. J. The adsorption of a range of dietary carcinogens by a-cellulose, a model insoluble dietary fiber. **Mutation Research**, n. 319, 1993, p. 257-266.

FRANKE, S. I. R; PRÁ, D; DA SILVA, J; ERDTMANN, B; HENRIQUES, J. A. P. Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. **Mutation Research**, n. 583, 2005, p. 75-84.

FRANKE, S. I.R; PRÁ, D; ERDTMANN, B; HENRIQUES, J. A. P; DA SILVA, J. Influence of orange juice over genotoxicity induced by alkylating agents: an in vivo analysis. **Mutagenesis**, n. 20, 2005, p. 279-283.

FRIAS, D. A. & SGARBIERI, V. C. Guar gum effects on blood serum lipids and glucose concentrations of Wistar diabetic rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, 1998, p.241-245.

GARCIA-OCHOA, F; SANTOS, V. E; CASA, A; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, n. 8, 2000, p. 549-579.

GRIZARD, D; DALLE, M; BARTHOMEUF, C. Changes in insulin and corticosterone levels may partly mediate the hypolipidemic effect of guar gum and low-molecular weight pectin in rats. **Nutrition Research**, n. 21, 2001, p. 1185-1190.

HAYWARD, A. C. In: Gibbs, B. M. & Skinner, F. A. Identification Methods for Microbiologists. Part A. New York: Academic Press,1966, p. 9-14.

HEUSER, V. D; SILVA, J; MORISKE, H-J; DIAS, J. F; YONEAMA, M. L; FREITAS, T. R. Genotoxicity Biomonitoring in Regions Exposed to Vehicle Emissions Using the Comet assay and the Micronucleous test in Native Rodent *Ctenomys minutus*. **Enviromental and Molecular Mutagenesis**, n. 40, 2002, p. 227-235.

HOEBEE, B; STOPPELAAR, J. M. The isolation of rat chromosome probes and their application in cytogenetic tests. **Mutation Research**, n. 372, 1996, p.205-210.

INNAMI, S;SHIMIZU, J; KUDOH, K. Dietary fiber and gastrointestinal functions. In: **Hydrocolloids. Part 2**. Japan: K. Nishinari, 2000, p.383-392.

JANSSON, P. E; KENNE, L; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, n. 45, 1975, p. 275-285.

JEANNES, A; PITTSLEY, J. E; SENTI, F. R. Polysaccharide B-1459: A new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. **Journal Applied. Polymer**, n. 5, 1961, p. 519-526.

JEANNES, A. Extracellular microbial polysaccharides – new hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, n. 5, 1974, p. 34-40.

KENNEDY, J. F; JONES, P. BARKER, S. A. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 4, n. 1, 1982, p. 39-43.

LABORATORY IMAGING. Disponível em: <<http://www.laboratory-imaging.com>>
Acesso em: 8 de abril de 2003.

LEVRAT-VERNY, M. A; BEHR, S; MUSTAD, V; RÉMÉSY, C; DEMIGNÉ, C. Low levels of viscous hydrocolloids lower plasma cholesterol in rats primarily by impairing cholesterol absorption. **Journal of Nutrition**, n. 130, 2000, p. 243-248.

MAJEROWICZ, J. In: Binsfeld, P. C. (organizador). **Biossegurança em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004, p. 101-124.

MAVOURNIN, K. H; BLAKEY, D. H; CIMINO, M. C; SALAMONE, M. F; HEDDLE, J. A. The in vivo Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. **Mutation Research**, n. 239, 1990, p. 29-80.

MALLET, A. K; WISE, A; ROWLAND, I. R. Hydrocolloid food additives and rat caecal microbial enzyme activities. **Food Chemical Toxicology**, v. 22, n. 6, 1984, p. 415-418.

MALUF, S. W. **Monitoramento da Genotoxicidade causada por exposição ocupacional**. 1994, 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MILLER, B; ALBERTINI, S; LOCHER, F. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vivo chromosome aberration test: industrial experience. **Mutation Research**, 392, 1997, p. 45-59.

MISAKI, A. In: **Food Hydrocolloids: Structure, properties and functions**. Japan: K. Nishinari & E. Doi, 1992, p.1-20.

MOORE, L. E; WARNER, M. L; SMITH, A. H; KALMAN, D; SMITH, M. T. Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 27, 1996, p.176-184.

MOREIRA, A. da S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. 2002, 73 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MORRIS, E. R. Rheology of xanthan: Suspension of particles and stabilization of emulsions. **Food & Ingredients Journal of Japan**, 167, 1996, p. 31-36.

MUGFORD, C. A. & KEDDERIS, G. L. Sex-dependent metabolism of xenobiotics. **Drug Metab.**, 30, 1998, p. 441-498.

ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutation Research**, n. 386, 1997, p. 39-67.

OLIVE, P. L; BANÁTH, J. P; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiat. Res.**, n. 122, 1990, p. 69-72.

OU, S; KWOK, K; LI, Y; FU, L. In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 42, n. 4, 1985, p. 597-603.

PAZUR, J. H; MISKIEL, F. J; MARCHETTI, N. T. Properties and applications of anti-xanthan antibodies. **Carbohydrate Polymers**, n.27, 1995, p. 85-91.

PEACE, B. E; SUCCOP, P. Spontaneous micronucleous frequency and age: what normal values **Mutation Research**, 425, 1999, p. 225-230.

RABELLO-GAY, M. N; RODRIGUES, M. A. R; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagenese, Carcinogenese e Teratogenese: Métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991, 246p.

RIBEIRO, L. R; SALVADORI, D. M. F; MARQUES, E. K. **Mutagenese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003, 356P.

ROJAS, E; LOPEZ, M. C; VALVERDE, M. Single Cell Gel Electrophoresis Assay: Methodology and Applications. **Journal of Chromatography**, B 722, 1999, p. 225-254.

SASAKI, Y. F; KAWAGUCHI, S; KAMAYA, A; OHSHITA, M; KABASAWA, K; IWAMA, K; TANIGUCHI, K; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research**, 519, 2002, p.103-119.

SINGH, N. P; MCCOY, M. T; TICE, R. R; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Res**, 175, 1988, p.184-191.

SLAVIN, J. L & GREENBERG, N. A. Partially hydrolyzed guar gum: clinical nutrition uses. **Nutrition**, n. 19, 2003, p. 549-552.

SÖDERKVIST, P; AXELSON, O. On the use of molecular biology data in ocupacional and environmental epidemiology. **Journal Occupational Environmental Medicine**, 37, 1995, p. 84-90.

SOH, H.S; KIM, C. S; LEE, S.P. A new in vitro assay of cholesterol adsorption by food and microbial. **J. Med. Food**, v. 6, n. 3, 2003, p. 225-230.

SOUW, P. & DEMAIN, A. L. Nutritional studies on xathanproduction by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Applied and Environmental Microbiology**, 37, n. 6, 1979, p. 1186-1192.

SUTHERLAND, I. W. Extracellular polysaccharide. **Biotechnology**, 3, 1983, p. 531-574.

TESSMANN, C. Caracterização Molecular de *Xanthomonas campestris* pv pruni pela técnica de RAPD e relação da planta hospedeira e com a produção, viscosidade e composição química da xantana. Dissertação (Mestrado em Ciências). UFPel, DCTA, FAEM, 2002, 34 f.

TICE, R; AGURELL, E; ANDERSON, D; BURINSON, B; HARTMANN, A; KOBAYASHI, H; MIYAMAE, Y; ROJAS, E; RYU, J. C; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, n. 35, 2000, p. 206-221.

VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. Tese (Doutorado em Ciências) UNICAMP, 1994, 141f.

VON POSER, G. L. In: Simões, C. M. O; Schenkel, E. P; Gosmann, G; De Mello, J. C. P; Mentz, L. A; Petrovick, P. R. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 3ª edição. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2001, p. 427-442.

ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996, 336 p.

ZUCCHI, T. M. A. D; POLI, P; DE MELLO, M. A; ZUCCHI, T. D; ZUCCHI, F. D; DE CASTRO, V. L. S. S. Biomarcadores: Sentinelas Ambientais. In: Binsfeld, P. C. (organizador). **Biossegurança em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004, 367 p.

7 ANEXOS

ANEXO A. Tabela I de Aditivos Intencionais (Decreto Lei nº 55.871 de 1965), revisada pela Resolução CNS/MS nº 04 de 24 de novembro de 1988.

ANEXOS

TABELA I - ADITIVOS INTENCIONAIS

ACIDULANTES

ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100g – g/100ml
ÁCIDO ADÍPICO (H.I)	Balas, caramelos e similares	1,00
	Gelados comestíveis	0,20
	Geleias Artificiais	0,20
	Preparados sólidos para refrescos	0,20 no p.s.c.
	Refresco	0,20
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,20 no p.s.c.
ÁCIDO CÍTRICO (H.II)	Amargos e aperitivos	0,30
	Alimentos processados à base de cereais	q.s.p.
	Aguardentes compostas	0,30
	Balas, caramelos e similares	q.s.p.
	Bebida alcoólica de gengibre	0,30
	Bebidas alcoólicas mistas	0,30
	Bebida alcoólica de jurubeba	0,30
	Biscoitos e similares, recheios e revestimentos	q.s.p.
	Batidas	0,30
	Bombons e similares	q.s.p.
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	q.s.p.
	"Cooler"	q.s.p.
	Condimentos e seus preparados concentrados ou desidratados	q.s.p.

	Conservas de pescado	q.s.p
	Doces em pasta	q.s.p
	Filtrado doce	q.s.p
	Gelados comestíveis	q.s.p
	Geleias	q.s.p
	Gomas de mascar	q.s.p
	Hortaliças em conservas	q.s.p
	Leite de coco	q.s.p
	Licores	0,20
	Maioneses	q.s.p
	Mistela compostas	q.s.p
	Mistela	q.s.p
	Molhos e coberturas para saladas	q.s.p
	Néctares de frutas	q.s.p
	Pós para coberturas de bolos	q.s.p
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	q.s.p
	Produtos cárneos	0,30
	Produtos de frutas	0,30
	Produtos de panificação	q.s.p
	Produtos de confeitaria	q.s.p
	Queijos não curados	q.s.p
	Refrescos e refrigerantes	q.s.p
	Sangria	q.s.p
	Sobremesas e pós para sobremesas de gelatinas flans pudins e similares	0,20 no p.s.c
	Preparados concentrados e desidratados para sopas e caldos	q.s.p
	Vinhos	q.s.p
	Vinhos compostos	0,50
	Vinhos de frutas	q.s.p
	Xaropes para refrescos	q.s.p
ÁCIDO FÓSFORICO (H.III)	Doces em pasta	0,10
	Preparados líquidos para refrescos e refrigerantes que não contenham sucos de frutas	0,06 no p.s.c
	Refrescos e refrigerantes que não contenham sucos de frutas	0,06
	Xaropes para refrescos que não contenham sucos de frutas	0,06no p.s.c.
ÁCIDO FUMÁRICO (H.IV)	Gelados comestíveis	0,20
	Geleias de frutas	0,20
	Pós para cobertura de bolos	0,20 no p.s.c
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	0,20 no p.s.c
	Refrescos e refrigerantes	0,20
	Sobremesas e pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,20 no p.s.c
ÁCIDO LÁCTICO (H.VIII)	Amargos e aperitivos	0,30
	Aguardentes compostas	0,30
	Balas, caramelos e similares	q.s.p
	Batidas	0,30
	Bebidas alcoólicas mistas	0,30
	Biscoitos e similares	q.s.p
	Bombons e similares	q.s.p
	Cerveja (somente na preparação do mosto de malte)	0,10
	Cooler	q.s.p
	Charque e carne bovina salgada e curada	2,00 no sal
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	0,30 no p.s.c
	Conservas vegetais em meio láctico-acético	1,00
	Condimentos preparados	q.s.p
	Creme vegetal	0,05
	Doces em pastas	q.s.p

	Filtrado doce	q.s.p
	Gelados comestíveis	q.s.p
	Geleias artificiais	0,20
	Gomas de mascar	q.s.p
	Hortaliças em conservas	q.s.p
	Licores	0,30
	Leite de coco	q.s.p
	Leite em pó acidificado	q.s.p
	Leite empregado na elaboração de margarinas	q.s.p
	Maioneses	q.s.p
	Margarina	0,05
	Molhos e coberturas para saladas	q.s.p
	Néctares de frutas	q.s.p
	Pescado salgado, salgado e prensado, salgado seco (na salga a seco ou na salmoura destinada a sua elaboração)	2,00 sobre o peso do sal empregado
	Picles	q.s.p
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	q.s.p
	Produtos de confeitaria	q.s.p
	Produtos de panificação	q.s.p
	Produtos de frutas	0,20
	Queijos não curado	q.s.p
	Refrescos e refrigerantes	q.s.p
	Sangria	q.s.p
	Sopas e caldos e seus preparados concentrados	q.s.p
	Vinhos	q.s.p
	Vinhos de frutas	q.s.p
	Xaropes para refrescos	0,30 no p.s.c.
ÁCIDO MALICO (H.VIII)	Aguardentes compostas	0,30
	Alimentos processados à base de cereais	0,20
	Amargos e aperitivos	0,30
	Balas, caramelos e similares	1,00
	Batidas	0,30
	Bebidas alcoólicas mistas	0,30
	Biscoitos e similares	q.s.p
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	0,30 no p.s.c
	Gelados comestíveis	0,02
	Gomas de mascar	1,00
	Licores	0,30
	Néctares de frutas	q.s.p
	Pós para coberturas de bolos	0,20 no p.s.c
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	q.s.p
	Produtos de confeitaria	0,20
	Produtos de frutas	0,20
	Refrescos e refrigerantes	q.s.p
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,20 no p.s.c
	Xaropes para refrescos	0,30 no p.s.c
ÁCIDO TARTÁRICO (H.IX)	Amargos e aperitivos	0,30
	Aguardentes compostas	0,30
	Bebidas alcoólicas mistas	0,30
	Bebidas alcoólicas de jurubeba	0,30
	Bebida alcoólica de gengibre	0,30
	Balas, caramelos e similares	0,50
	Biscoitos e similares	0,50
	Bombons e similares	0,20
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	0,30 no p.s.c
	Cooler	q.s.p
	Doces em pasta	0,20

	Filtrado doce	q.s.p
	Gelados comestíveis	0,02
	Geleias	q.s.p
	Gomas de mascar	0,50
	Licores	0,30
	Leite de coco	q.s.p
	Néctares de frutas	q.s.p
	Pós para cobertura de bolos	0,02 no p.s.c
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	0,50 no p.s.c
	Produtos de confeitaria	0,20
	Produtos de frutas	q.s.p
	Refrescos e refrigerantes	0,30
	Sangria	q.s.p
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,02 no p.s.c.
	Sopas e caldos e seus preparados concentrados	q.s.p
	Vinho (como corretivo) e suco de uva reconstituído	q.s.p.
	Xaropes para refrescos	0,30 no p.s.c
GLUCONA DELTA LACTONA (H.X)	Produtos cárneos, curados	0,50

No p.s.c - no produto a ser consumido

q.s.p - quantidade suficiente para obter o efeito desejado

ANTIESPUMANTES

ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODE SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100g – g/100ml
Dimetilpolisiloxana (AT.I)	Óleos e gorduras para fins industriais	0,001
	Preparados líquidos para refrescos e refrigerantes	0,002 no p.s.c

No p.s.c. - no produto a ser consumido

ANTIOXIDANTES

ADITIVOS	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100g – g/100ml
ÁCIDO ASCÓRBICO (ÁCIDO L-ASCÓR- BICO E SEUS SAIS DE POTÁSSIO, SÓ- DIO E CÁLCIO) (A.I)	Amargos e aperitivos	0,03
	Alimentos infantis	0,05
	Azeitonas	0,02
	Alimentos processados à base de cereais	0,05
	Batatas cruas descascadas e congeladas	0,20
	Batatas fritas congeladas	0,01
	Batidas	0,03
	Cervejas	0,03
	Cogumelos frescos, secos ou em conserva	0,20
	Condimentos preparados	0,10 no p.s.c
	"Cooler"	0,03
	Creme vegetal	0,30
	Doces em pasta	0,05
	Filtrado doce	0,03
	Frutas cristalizadas e glaceadas	0,005
	Frutas em conservas	0,03

	Gomas de mascar	0,03 calculado sobre a base gomosa
	Hortalças em conservas	0,03
	Leite de coco	0,01
	Licores	0,03
	Margarina	0,30
	Mistela composta	0,03
	Molhos e coberturas para saladas	q.s.p
	Néctares de frutas	0,03
	Produtos cárneos curados	0,20
	Óleos e gorduras	0,03
	Picles	0,03
	Polpa de frutas	0,03
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	0,03 no p.s.c
	Preparados desidratados e concentrados para sopas e caldos	0,10 no p.s.c
	Produtos de frutas	0,05
	Refrescos e refrigerantes	0,03
	Saquê	0,01
	Sangria	0,03
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,03 no p.s.c
	Sucos de frutas	0,03
	Vinhos	0,01
	Vinhos de frutas	0,01
	Xaropes para refrescos	0,03 no p.s.c
ÁCIDO CITRICO (A.II)	Coco ralado	q.s.p
	Condimentos preparados	q.s.p
	Creme vegetal	q.s.p
	Gomas de mascar	q.s.p
	Hortalças em conservas	q.s.p
	Leite de coco	q.s.p
	Margarinas	q.s.p
	Molhos e coberturas para saladas	q.s.p
	Óleos e gorduras	q.s.p
	Produtos cárneos curados	0,20
	Picles	q.s.p
	Produtos de frutas	q.s.p
	Sopas e caldos concentrados	q.s.p
	Vegetais em conserva (em meio láctico acético)	(0,20)
ÁCIDO FOSFÓRICO (A.III)	Gorduras e compostos gordurosos	0,01
	Margarinas	0,01
ÁCIDO ISOASCÓRBICO OU ERITÓRBICOS E SEU SAL DE SÓDIO (A.XIV)	Amargos e aperitivos	0,01
	Batatas	0,01
	Cervejas	0,01
	Cogumelos frescos, secos ou em conservas	0,03
	Cooler	0,01
	Creme vegetal	0,20
	Filtrado doce	0,01
	Frutas em conservas	0,05
	Geleias de frutas	0,05
	Gomas de mascar	0,03 calculado sobre o peso da base gomosa
	Hortalças em conservas	0,03
	Licores	0,01
	Margarinas	0,20

	Mistela	0,01
	Mistela composta	0,01
	Néctares de frutas	0,01
	Óleos e gorduras	0,03
	Polpa de frutas	0,03
	Preparados sólidos e líquidos para Refrescos e refrigerantes	0,01 no p.s.c
	Produtos de frutas	0,05
	Refrescos e refrigerantes	0,01
	Saquê	0,01
	Sucos de frutas	0,01
	Vinhos	0,01
	Vinhos de frutas	0,01
	Xaropes para refrescos	0,01 no p.s.c
BUTIL HIDROXIANISOL (BHA) (A.V)	Alimentos processados a base de cereais	0,02 sobre o teor de óleo
	Coco ralado	0,01 calculado sobre o teor de gordura
	Creme vegetal	0,02
	Gomas de mascar	0,01 calculado sobre o peso da base gomosa
	Leite de coco	0,01
	Margarina	0,02
	Óleos e gorduras	0,02
	Produtos de cacau	0,02
BUTIL HIDROXITOLUENO (BHT) (A.VI)	Alimentos processados a base de cereais	0,01 sobre o teor de óleo
	Coco ralado	0,01 calculado sobre o teor da gordura
	Creme vegetal	0,02
	Gomas de mascar	0,05 calculado sobre o peso da base gomosa
	Leite de coco	0,01
	Margarina	0,02
	Óleos e gorduras	0,01
	Produtos de cacau	0,02
CITRATO DE MONOGLICERÍ- DEOS (A.XIII)	Batidas	0,02
	Creme vegetal	0,01
	Gelados comestíveis	0,02
	Gorduras para coberturas	0,02
	Licores	0,02
	Margarinas	0,01
	Molhos e coberturas para saladas	0,02
	Óleos e gorduras	0,02
	Sobremesas e pós para sobremesas de flans, pudins e similares	0,02 no produto a ser consumido
	Produtos de confeitaria	0,02
CITRATO DE MONOISOPROPILA (A.VII)	Biscoitos e similares	0,01
	Creme vegetal	0,01
	Margarinas	0,01
	Óleos e gorduras	0,01
CLORETO ESTANOSO (A.XX)	Vegetais em conservas	0,0025
EDTA – ÁCIDO	Cogumelos em conservas	0,02

DISSÓDICO (ETILENODIAMINO TETRACETATO DIÁCIDO DISSÓ- DICO) (A.XXI)	Gomas de mascar	0,01 calculados sobre o peso da base gomosa
	Hortalças em conservas (batata)	0,01
	Hortalças em conservas (feijão fradinho)	0,015
	Produtos de frutas	0,01
EDTA – CÁLCICO DISSÓDICO (ETILENODIAMINO TETRACETATO CÁLCICO E DISSÓDICO) (A.XII)	Água gaseificada	0,0033
	Creme vegetal	0,01
	Gomas de mascar	0,01 calculado sobre o peso da base gomosa
	Cogumelos em conserva	0,02
	Condimentos preparados	0,01 no p.s.c
	Gorduras e compostos gordurosos	0,01
	Hortalças em conservas (batata)	0,01
	Hortalças em conservas (feijão fradinho)	0,015
	Maioneses	0,01
	Margarinas	0,01
	Molhos e coberturas p/saladas	0,01 no p.s.c
GALATO DE PROPILO DE DUODECILA OU DE OCTILA (A.IX)	Preparados líquidos para refrescos e refrigerantes	0,0033 no p.s.c
	Refrescos e refrigerantes	0,0033
	Coco ralado	0,01 calculado sobre o teor de gordura
	Creme vegetal	0,01
	Gomas de mascar	0,01 calculado sobre o peso da base gomosa
	Leite de coco	0,01
	Margarina	0,01
	Óleos e gorduras	0,01
	Produtos de cacau	0,01
LECITINAS (FOSFOLIPÍDEOS, FOSFATÍDEOS E FOSFOLUTEÍNAS) (A.VIII)		
	Biscoitos e similares	0,20
	Coco ralado	0,20 calculado sobre o teor de gordura
	Creme vegetal	0,50
	Gelados comestíveis	0,10
	Gomas de mascar	0,20 calculado sobre o peso da base gomosa
	Gelados comestíveis	0,10
	Leite de coco	0,20
	Margarina	0,50
	Óleos e gorduras	0,20
	Pós para coberturas de bolos	0,10 no p.s.c
PALMITATO DE ASCORBILA E ESTEARATO DE ASCORBILA (A.XV)	Produtos de cacau	1,00
	Alimentos à base de cereais processados	0,02 calculado sobre o teor de gordura
	Coco ralado	0,02 calculado sobre o teor de gordura
	Conservas alimentícias para uso infantil	0,02 calculado sobre o teor de gordura
	Creme vegetal	0,05
	Gomas de mascar	0,03 calculado sobre o peso da base gomosa
	Leite de coco	0,02 calculado sobre o peso da gordura
	Margarinas	0,02
	Óleos e gorduras	0,05

TERC-BUTIL-HIDROQUINONA (TBHQ) (°XIX)	Alimentos processados à base de cereais	0,02 sobre o teor de óleo
	Farinhas, extratos e flocos derivados da soja integral	0,02 sobre o teor de óleos e gorduras originais do produto
	Gomas de mascar	0,02 calculado sobre o teor da base gomosa
	Óleos e gorduras	0,02
TOCOFERÓIS (°XI)	Alimentos à base de cereais processados	0,03 calculado sobre o teor de óleo
	Coco ralado	0,03 calculado sobre o teor de gordura
	Creme vegetal	0,03
	Gomas de mascar	0,03 calculado sobre o peso da base gomosa
	Leite de coco	0,03
	Margarinas	0,03
	Óleos e gorduras	0,03
	Produtos de cacau	0,03
	Sopas e caldos	0,05

No p.s.c - no produto a ser consumido

q.s.p - quantidade suficiente para obter o efeito desejado

AROMAS

ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100g – g/100ml
AROMA NATURAL, AROMA NATURAL REFORÇADO, AROMA RECONSTITUÍDO, AROMA IMITAÇÃO	Alimentos processados a base de cereais	q.s.p
	Açúcar (somente aromas imitação)	q.s.p
	Aguardentes compostas	q.s.p
	Arac	q.s.p
	Balas, caramelos e similares	q.s.p
	Bebida alcoólica de jurubeba	q.s.p
	Bebida alcoólica de gengibre	q.s.p
	Bebidas alcoólicas mistas	q.s.p
	Bebidas alcoólicas destilado-retificadas	q.s.p
	Batidas	q.s.p
	Biscoitos e similares	q.s.p
	Bombons e similares	q.s.p
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	q.s.p
	Conhaque	1,00
	Creme vegetal	q.s.p
	Condimentos preparados (somente óleos essenciais, oleorresinas, extratos ou tinturas, obtidas a partir de vegetais e/ou especiarias normalmente utilizadas na alimentação humana)	q.s.p
	Concentrados para refrigerantes à base de aromatizantes	q.s.p
	Cooler	q.s.p
	Chocolates	q.s.p
	Frutas cristalizadas e glaceadas	q.s.p
	Frutas em conserva	q.s.p
	Gelados comestíveis	q.s.p
	Geleias e doces de frutas	q.s.p
	Gomas de mascar	q.s.p
	Gorduras e compostos gordurosos	q.s.p
	Iogurtes aromatizados	q.s.p
	Licores	q.s.p

	Leites aromatizados, leites gelificados aromatizados	q.s.p
	Leites fermentados	q.s.p
	Margarinas	q.s.p
	Mistura para produtos de panificação ou de confeitaria	q.s.p
	Mistela composta	q.s.p
	Picles (somente aromas naturais)	q.s.p.
	Pós para cobertura de bolos	q.s.p
	Produto de panificação (exceto pão francês)	q.s.p.
	Preparados sólidos ou líquidos para refrescos e refrigerantes	q.s.p
	Produtos de confeitaria	q.s.p
	Produtos de cacau	q.s.p
	Produtos de frutas	q.s.p
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijo tipo petit-suisse e similares	q.s.p
	Produtos derivados de soja	q.s.p
	Queijos aromatizados e/ou condimentos	q.s.p
	Recheios e revestimentos de produtos de confeitaria e de biscoitos e similares	q.s.p
	Recheios e revestimentos de produtos de confeitaria e de biscoitos e similares	q.s.p
	Recheios de chocolate, de bombons e similares	q.s.p
	Refrescos e refrigerantes	q.s.p
	Sangria	q.s.p
	Sobremesas e pós para sobremesas de gelatinas, flan, pudins e similares	q.s.p
	Sopas e caldos concentrados	q.s.p
	Uísque	(1,00)
	Vinhos compostos	q.s.p
	Xaropes para refrescos	q.s.p
AROMA NATURAL DE FUMAÇA (ALIMENTOS AOS QUAIS SE DESEJA CONFERIR SABOR DE DEFUMADO)		
	Alimentos processados a base de cereais	0,006
	Balas	0,006
	Biscoitos e similares	0,006
	Condimentos preparados	0,0015
	Molhos	0,0015
	Produtos cárneos defumados (somente como reforço)	0,009
	Produtos de pescado defumado (somente nos tipos consagrados)	0,009
	Preparados desidratados e concentrados para sopas e caldos	0,006 (no produto a ser consumido)
AROMA ARTIFICIAL	Queijos defumados (somente como reforço nos tipos consagrados)	0,009
	Alimentos processados à base de cereais	q.s.p
	Balas, caramelos e similares	q.s.p.
	Biscoitos e similares	q.s.p
	Bombons e similares	q.s.p.
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	q.s.p
	Creme vegetal	q.s.p
	Gelados comestíveis	q.s.p
	Gomas de mascar	q.s.p
	Gorduras para fins industriais	q.s.p.
	Iogurtes aromatizados	q.s.p.
	Leites aromatizados, leites gelificados aromatizados	q.s.p
	Leites fermentados	q.s.p
	Margarinas	q.s.p
	Misturas para produtos de panificação ou de confeitaria	q.s.p
	Licores	q.s.p
	Produtos de confeitaria	q.s.p
	Pós para cobertura de bolos	q.s.p
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	q.s.p
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipos petit-suisse e similares	q.s.p
	Recheios e revestimentos de produtos de confeitaria de biscoitos e similares	q.s.p
	Recheios de chocolates de bombons e similares	q.s.p
	Refrescos e refrigerantes	q.s.p
	Sobremesas e pós para sobremesas de gelatinas, flans pudins e similares	q.s.p.
	Xaropes para refrescos	q.s.p.

No p.s.c - no produto a ser consumido

q.s.p - quantidade suficiente para obter o efeito desejado

ANTIUMECTANTES

ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MAXIMO g/100g – g/100ml
ALUMÍNIO ALUMÍNIO SILICATO DE SÓDIO (AU.VII)	Condimentos em pó preparados	2,00
	Gemas desidratadas	2,00
	Ovo integral desidratado	2,00
	Preparados desidratados e concentrados para sopas e caldos	0,0015
	Sal de mesa	1,00
CARBONATO DE CÁLCIO (AU.I)	Preparados sólidos para refrescos e refrigerantes	2,5 em relação ao peso do pó
	Sal de mesa	2,50
CARBONATO DE MAGNÉSIO (AU.II)	Sal de mesa	2,50
CITRATO DE FERRO AMONIA- CAL (AU.IV)	Sal de mesa	0,002
DIÓXIDO DE SILÍCIO (AU.VIII)	Condimentos em pó preparados	2,00
	Preparados sólidos para refrescos	2,00
	Sal de mesa	1,00
	Preparados desidratados para sopas e caldos	2,00
	Em sais de cura (associado a nitrato/nitrito de potássio ou sódio e ascorbato de potássio ou sódio, usados como conservantes/fixadores de cor)	2,00
	Pós para sobremesas de gelatina	2,00
	Preparados desidratados para sopas e caldos	2,00
	Preparados sólidos para refrescos	2,00
FERROCIANETO DE SÓDIO (AU.VI)	Sal de mesa	0,0005 (calculado como sal anidro)
FOSFATO TRICÁLCICO (AU.III)	Biscoitos e similares	2,50
	Preparados sólidos para refrescos e refrigerantes	2,50 em relação ao peso do pó
	Sal de mesa	2,50
HIDRÓXIDO DE MAGNÉSIO (AU.IX)	Preparados sólidos para refrescos e refrigerantes	2,50 em relação ao peso do pó
ÓXIDO DE MAGNÉSIO (AU.X)	Preparados sólidos para refrescos e refrigerantes	2,50 em relação ao peso do pó
SILICATO DE CÁLCIO (AU.V)	Sal de mesa	1,00
SILICATO DE ALUMÍNIO (AU.XII)	Sal de mesa	1,00
SAIS DE ALUMÍ- NIO, CÁLCIO, MAG- NÉSIO, POTÁSSIO, SÓDIO E AMÔNIO DOS ÁCIDOS MI- RÍSTICO, PALMITI- CO E ESTEÁRICO (AU.XI)	Café em pó solúvel	2,00
	Condimentos em pó preparados	2,00
	Pós para preparado de alimentos	2,00
	Preparados desidratados para sopas e caldos	0,0015
	Preparados sólidos para refrescos e refrigerantes com sucos de frutas	2,00
	Sal de mesa	2,00
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	2,00

q.s.p. - quantidade suficiente para obter o efeito desejado

CORANTES

ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100g – g/100ml
CORANTES NATURAIS (ANEXO III –C.I) CORANTES SINTÉTICOS IDÊNTICOS AOS NATURAIS (ANEXO III C.III)	Alimentos processados a base de cereais	q.s.p.
	Amargos e Aperitivos (somente corantes naturais)	q.s.p.
	Balas, caramelos e similares	q.s.p.
	Balidas (somente corantes naturais)	q.s.p.
	Cereja em calda, para reconstituição da cor perdida durante o processamento	q.s.p.
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	q.s.p.
	Cobertura de bolos, pós para cobertura de bolo	q.s.p.
	"Cooler"	q.s.p.
	Creme vegetal	q.s.p.
	Queijos (exclusivamente na crosta)	q.s.p.
	Gorduras e compostos gordurosos	q.s.p.
	Gelados comestíveis	q.s.p.
	Geléias	0,02
	Gomas de mascar	q.s.p.
	Iogurtes aromatizados	q.s.p.
	Leites aromatizados	q.s.p.
	Leites gelificados aromatizados	q.s.p.
	Manteiga (nos tipos permitidos)	q.s.p.
	Margarinas	q.s.p.
	Massas alimentícias sem ovos	q.s.p.
	Massas frescas, recheadas ou não pré-embaladas e com umidade superior a 15%	q.s.p.
	Massas semi-prontas, recheadas ou não, para o preparo de produtos forneáveis, doces ou salgados, pré-embaladas e com umidade superior a 15%	q.s.p.
	Mistelas compostas (corante natural)	q.s.p.
	Molhos (exceto à base de tomate)	q.s.p.
	Néctares de frutas (somente corante natural)	q.s.p.

	Oleos vegetais (somente para reconstituição da cor perdida durante o processamento)	q.s.p.
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	q.s.p.
	Produtos de confeitaria	q.s.p.
	Produtos cárneos (hemoglobina na massa e urucu na superfície ou na superfície ou no revestimento de embutidos cozidos)	q.s.p.
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijo tipo petit-suisse e similares	q.s.p.
	Proteína texturizada de soja	.s.p.q
	Queijo tipo prato (somente urucu)	q.s.p.
	Recheios de bombons e similares	q.s.p.
	Recheios e revestimentos de biscoitos e produtos de confeitaria (com exceção dos recheios e cremes com ovos)	q.s.p.
	Refrescos e refrigerantes	q.s.p.
	Recheios e revestimentos de produtos de confeitaria (exceto os recheios de creme de ovos)	q.s.p.
	Recheios de bombons e similares	q.s.p.
	Recheios de chocolate	q.s.p.
	Recheios e revestimentos de biscoito (com exceção dos recheios de creme com ovos)	q.s.p.
	Revestimento de embutidos cozidos de carne	q.s.p.
	Sangria	q.s.p.
	Sobremesas e pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	q.s.p.
	Sopas e caldos concentrados	0,003 no produto a ser consumido
	Sucos de frutas	q.s.p.
	Vinhos licorosos (somente corante natural)	q.s.p.
	Vinhos compostos (somente corantes naturais)	q.s.p.
	Xaropes para refrescos	q.s.p.
CORANTE CARAMELO (ANEXO III –C.V.)	Aguardente de cana envelhecida	q.s.p.
	Aguardente composta	q.s.p.
	Alimentos processados a base de cereais	q.s.p.
	Amargos e Aperitivos	q.s.p.
	Balas, caramelos e similares	q.s.p.
	Bebida alcoólica de gengibre	q.s.p.
	Bebida alcoólica de jurubeba	q.s.p.
	Bebidas alcoólicas mistas	q.s.p.
	Batidas	q.s.p.
	Biscoitos e similares	q.s.p.
	Cereais processados industrialmente	q.s.p.
	Cervejas	q.s.p.
	Coberturas e pós para coberturas de bolo	q.s.p.
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	q.s.p.
	Condimentos preparados	q.s.p.
	Conhaque	q.s.p.
	"Cooler"	q.s.p.
	Gelados Comestíveis	q.s.p.
	Geleias	q.s.p.
	Gomas de mascar	q.s.p.
	Iogurtes aromatizados	q.s.p.
	Leites aromatizados	q.s.p.
	Leites gelificados	q.s.p.
	Licores	q.s.p.
	Mistelas compostas	q.s.p.

	Molhos para conservas de carnes	q.s.p.
	Produtos a base de proteína de soja texturizada (exceto a ser utilizada em produtos cárneos)	q.s.p.
	Produtos de frutas, cereais, legumes, e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,01
	Produtos de confeitaria	q.s.p.
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	q.s.p.
	Proteína texturizada de soja	q.s.p.
	Recheios de bombons e similares	q.s.p.
	Recheios e revestimentos de biscoitos e produtos de confeitaria (com exceção dos recheios e cremes com ovos)	q.s.p.
	Refrescos e refrigerantes	q.s.p.
	Rum	q.s.p.
	Sangria	q.s.p.
	Sobremesas e pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	q.s.p.
	Sopas e caldos concentrados	q.s.p.
	Uisque	q.s.p.
	Vinhos compostos	q.s.p.
	Vinhos licorosos	q.s.p.
	Xaropes para refrescos	q.s.p.
CORANTES ARTIFICIAIS (ANEXO III – C.II) ADITIVO: AMARELO CREPÚSCULO F.C.F., BORDEAUX S OU AMARANTO, ERITROSINA, INDIGOTINA, PONCEUA 4R, TARTRAZINA, VERMELHO 40	Alimentos processados à base de cereais	0,01
	Balas, caramelos e similares	0,01
	Cerejas em calda (somente para reconstituição da cor)	0,01
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	0,01
	Gelados comestíveis	0,01
	Geleia de cereja	0,01
	Gomas de mascar	0,01
	Iogurtes aromatizados	0,01
	Leites gelificados aromatizados	0,005
	Leites aromatizados	0,005
	Leites fermentados aromatizados	0,005
	Licores	0,01
	Preparados líquidos ou sólidos para refrescos e refrigerantes	0,011 no p.s.c.
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,01
	Queijos (fuccina ou magenta somente na crosta dos tipos cpnsagrados)	0,01
	Recheios de bombons e similares	0,01
	Recheios de chocolates	0,01
	Recheios e revestimentos de produtos de confeitaria, biscoitos e similares (com exceção dos recheios de cremes com ovos)	0,01
	Refrescos e refrigerantes	0,01
	Sobremesas e pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,01 no p.s.c.
	Xaropes para refrescos	
ERITROSINA	Proteína de soja texturizada quando utilizada em produtos de salsicharia	0,01 calculada sobre o peso da proteína antes da reidratação

CORANTES INORGÂNICOS: (ANEXO III) ALUMÍNIO (C.IV)	Drágeas, confeitos e similares (somente para revestimento)	q.s.p.
CARBONATO DE CÁLCIO (C.IV)	Drágeas, confeitos e similares (somente nos revestimento)	q.s.p.
DIÓXIDO DE TITÂNIO (C.IV)	Preparados sólidos para refrescos e refrigerantes Drágeas, confeitos e similares (somente nos revestimento)	q.s.p. q.s.p.
ÓXIDOS E HIDRÓXIDOS DE FERRO (C.IV)	Drágeas, confeitos e similares (somente nos revestimento)	q.s.p.
OURO (C.IV)	Drágeas, confeitos e similares (somente nos revestimento)	q.s.p.
PRATA (C.IV)	Drágeas, confeitos e similares (somente nos revestimento)	q.s.p.

no p.s.c. - no produto a ser consumido

q.s.p. - quantidade suficiente para obter o efeito desejado

CONSERVADORES

ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100g – g/100ml
ÁCIDO BENZÓICO E SEUS SAIS DE SÓDIO, CÁLCIO E POTÁSSIO (P.I)	Aperitivos	0,05
	Cooler	0,05
	Creme vegetal	0,10
	Doces em pasta	0,10
	Leite de coco esterilizado	0,01
	Leite de coco pasteurizado	0,30
	Margarina	0,10
	Molhos	0,10
	Néctares de frutas	0,10
	Picles e azeitonas	0,10
	Preparados líquidos para refrescos e refrigerantes	0,05 no p.s.c
	Produtos de frutas	0,10
	Queijo fundido (exclusivamente na embalagem)	0,20
	Refrescos e refrigerantes	0,05
	Sangria	0,05
	Suco de frutas	0,10
ÁCIDO SÓRBICO E SEUS SAIS DE SÓDIO, POTÁSSIO E CÁLCIO (P.IV)	Licores	0,05
	Xaropes para refrescos	0,05 no p.s.c
	Amargos e aperitivos	0,05
	Bombons e similares	0,10
	Chocolates	0,10
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	0,10
	Coco ralado	0,20
	Cooler	0,10
	Creme vegetal	0,10
	Doces em pasta	0,20
	Filtrado doce	0,05
	Frutas cristalizadas e glaceadas	0,10
	Frutas dessecadas	0,05
	Geleias de frutas	0,10

	Leite de coco	0,20
	Licores	0,05
	Maioneses	0,10
	Margarinas	0,10
	Massas frescas, recheadas ou não, pré-embaladas e com umidade superior a 15%	0,20 sobre 0,20 (*) o peso do produto final
	Massas semi-prontas, recheadas ou não, para o preparo de produtos forneáveis, doces ou salgados, pré-embalados, e com umidade superior a	0,20 sobre o peso do produto final
	Molhos	0,10
	Néctares de frutas	0,10
	Picles e azeitonas	0,10
	Pizzas, pastéis, empadas, polentas pré-embaladas e com umidade superior a 15%	0,20 sobre o peso do produto final
	Preparados líquidos para refrescos e refrigerantes	0,01 no p.s.c
	Produtos de frutas	0,20
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,20
	Proteína texturizada de soja (exclusivamente) no produto que deverá ser pré-hidratado para fins industriais (exceto a utilizada em produtos cárneos)	0,60 na base seca
	Produtos de confeitaria	0,10
	Produtos de panificação (tratamento na crosta de produtos embalados)	0,10 sobre o peso do produto a ser consumido
	Produtos cárneos (somente nos revestimentos de embutidos maturados e cozidos, salames e mortadelas)	0,02
	Queijo (exclusivamente na crosta)	0,10
	Queijo ralado	0,20
	Queijos em fatias pré-embaladas	0,10
	Queijo pasteurizado e fatiado	0,10
	Recheios de chocolates, bombons e similares	0,10
	Refrescos e refrigerantes	0,01
	Sangria	0,10
	Saquê	0,02
	Sidras	0,05
	Sucos de frutas	0,10
	Vinhos	0,02
	Vinhos de frutas	0,02
	Xaropes para refrescos	0,01 no p.s.c.
	Vegetais em conservas (exceto os que sejam submetidas à esterilização)	0,10
DIÓXIDO DE ENXOFRE: METABISSULFITO DE SÓDIO, METABISSULFITO DE POTÁSSIO, METABISSULFITO DE CÁLCIO, SULFITO DE SÓDIO, SULFITO DE CÁLCIO, SULFITO DE POTÁSSIO, BISSULFITO DE CÁLCIO, BISSULFITO DE SÓDIO, BISSULFITO DE POTÁSSIO (P.V)	Apúcar refinado	0,002
	Batatas fritas congeladas	0,01
	Bebidas alcoólicas mistas	0,01
	Bebidas alcoólicas fermentadas	0,01
	Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria-prima após a captura)	0,003 (no produto cozido)
	Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria-prima após a captura)	0,01 (no produto cru)
	Coco ralado	0,02
	Cervejas (somente ditionito)	0,006
	Cooler	0,035
	Filtrado doce	0,035
	Frutas dessecadas	0,01
	Frutose	0,002
	Geleias artificiais	0,02

	Jeropiga	0,01
	Legumes e verduras desidratadas	0,02
	Leite de coco esterilizado	0,01
	Leite de coco pasteurizado	0,03
	Licores de frutas	0,01
	Mistela composta	0,025
	Néctares de frutas	0,02
	Passas de frutas	0,15
	Picles	0,01
	Preparados Sólidos e Líquidos para refrescos com sucos de frutas	0,008 no p.s.c
	Refrescos com sucos de frutas	0,008
	Refrigerantes	0,004 no p.s.c.
	Refrigerantes com sucos de frutas	0,004
	Sangria	0,035
	Saquê	0,035
	Sidras	0,035
	Sucos de frutas	0,02
	Vinagres	0,02
	Vinhos	0,035
	Vinhos compostos	0,025
	Vinhos de frutas	0,035
	Xaropes para refrescos com sucos de frutas	0,008 no p.s.c
NITRATO DE POTÁSSIO OU SÓDIO ASSOCIADO OU NÃO AO NITRITO DE SÓDIO OU DE POTÁSSIO (P.VII)	Produtos cárneos curados (exceto charque)	0,05
	Queijos (exceto queijos frescos) 0,02% sobre o peso do leite	0,005 no produto final expresso em ion nitrato
NITRITO DE POTÁSSIO OU SÓDIO (P.VIII)	Produtos cárneos curados (exceto charque e alimentos infantis)	0,02 usado isoladamente ou combinados, no produto a ser consumido expresso em ion nitrato
NATAMICINA (P.XII)	Queijos (na crosta)	2mg/100cm ² não havendo migração para a parte comestível do queijo
PROPIONATO DE CÁLCIO, SÓDIO OU POTÁSSIO (P.IX)	Bombons e similares	0,20
	Chocolates	0,20
	Extrato de malte e xarope de maltose	0,40
	Massas frescas, recheadas ou não, pré-embaladas e com umidade superior a 15%	0,20 sobre o peso do produto final
	Massas semi-prontas, recheadas ou não, para o preparo de produtos forneáveis, doces ou salgados, e com umidade superior a 15%	0,20 sobre o peso do produto final
	Misturas para produtos de panificação e de confeitaria	0,20 sobre o peso do produto final
	Picles	0,20
	Pizzas, pastéis, empadas, polentas pré-embaladas e com umidade superior a 15%	0,20 sobre o peso do produto final
	Produtos de confeitaria	0,20 sobre o peso do produto final
	Produtos de confeitaria	0,20 sobre o peso do produto final
	Produtos de panificação	0,20 sobre o peso da farinha
p-HIDROXIBENZOATO DE METILA, PROPILA, ETILA E SEUS SAIS SÓDICOS (P.III)	Picles	0,10

no p.s.c. - no produto a ser consumido

EDULCORANTES

ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100 – g/100ml
ASPARTAME (Artificial)	Alimentos dietéticos	75mg/100g
	Bebidas dietéticas	75mg/100ml
CICLAMATOS (Artificial)	Alimentos dietéticos	130mg/100g
	Bebidas dietéticas	130mg/100ml
ESTEVIOSÍDEO (Natural)	Alimentos dietéticos	60mg/100g
	Bebidas dietéticas	60mg/100ml
MANITOL (Natural)	Alimentos dietéticos	Sem limite
SACARINA (Artificial)	Alimentos dietéticos	30mg/100g
	Bebidas dietéticas	30mg/100ml
SORBITOL (Natural)	Alimentos dietéticos	Sem limite
	Bebidas dietéticas	Sem limite

No p.s.c. - no produto a ser consumido

q.s.p. - quantidade suficiente para obter o efeito desejado

ESPESSANTES

ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100 – g/100ml
ÁCIDO ALGÍNICO E SEUS SAIS DE: AMÔNIO, CÁLCIO, SÓDIO E POTÁSSIO (E.P.II)	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	1,00
	Creme de leite esterilizado	0,50
	Gelados comestíveis	1,00
	Leite aromatizado	0,50
	Leites gelificados	0,50
	Mistura em pó para bases cremosas	0,50
	Molhos gordurosos	1,00
	Molhos ou líquidos gordurosos de cobertura para hortaliças em conservas esterilizadas e saladas	0,50 no p.s.c.
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	0,50 no p.s.c.
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros	0,50 no p.s.c.
	Ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,50 no p.s.c.
	Recheios e revestimentos de produtos de confeitaria	0,01
	Refrescos e refrigerantes	0,50
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,50 no p.s.c.

AGAR-AGAR (E.P.I)	Creme vegetal	0,20
	Gelados comestíveis	0,50
	Geleia de mocotó	0,50
	Leites aromatizados	0,50
	Leite gelificado	0,50
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,50 no p.s.c.
	Recheios e revestimentos de produtos de confeitaria	0,50
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,50
	Sopas e caldos concentrados	0,50
CARBOXIMETILCELU-LOSE E SEU SAL SÓ-DICO (E.P.III)	Alimentos dietéticos	0,50
	Coberturas para saladas	0,50
	Creme de leite esterilizado	0,50
	Cobertura e xaropes para gelados comestíveis	0,50 no p.s.c.
	Creme vegetal	0,20
	Gelados comestíveis	0,50
	Leite aromatizado	0,10
	Leite gelificado	0,50
	Molhos cremosos	1,50
	Mistura em pó para bases cremosas	0,50
	Pós para cobertura de bolos	0,50
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,50 no p.s.c.
	Produtos de confeitaria	1,50 no p.s.c.
	Produtos de panificação	1,50 sobre o peso da farinha
	Queijos cremosos	0,30
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,50 no p.s.c.
CELULOSE MICRO-CRISTALINA (E.P.XI)	Alimentos dietéticos	0,50
	Coberturas e pós para cobertura de sobremesas	0,50 no p.s.c.
	Coberturas para saladas	0,50
	Gelados comestíveis	0,50
	Molhos cremosos	1,50
	Pós para cobertura de bolos	0,50 no p.s.c.
	Pós para sorvetes	0,50 no p.sc.
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,50 no p.s.c
GOMA ADRAGANTE (E.P.IV)	Gelados comestíveis	0,50
	Gomas de mascar	0,50
	Molhos cremosos	0,50
GOMA ARÁBICA (E.P.V.)	Balas, caramelos e similares	0,50
	Creme de leite esterilizado	0,50
	Gelados comestíveis	0,50
	Gomas de mascar	0,50
	Molhos ou líquidos gordurosos de cobertura para hortaliças em conservas	1,00 no p.s.c
	Produtos de frutas	0,50
GOMA CARAIA (E.P.VI)	Gelados comestíveis	0,50
	Gomas de mascar	0,50
	Leites aromatizados	0,50
	Leites gelificados	0,50
	Produtos de frutas	0,50

	Sobremesas e pós para sobremesas de flans, pudins e similares	0,50 no p.s.c.
GOMA DE ALFARROBA OU JATAÍ (E.P.VIII)	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	0,50
	Creme de leite acidificado	0,50
	Creme de leite esterilizado	0,50
	Creme vegetal	0,20
	Gelados comestíveis	0,50
	Gomas de mascar	0,50
	Leites aromatizados	0,50
	Leites gelificados	0,50
	Molhos e cobertura para saldas	0,50
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,50 no p.s.c.
	Queijos cremosos	0,50
	Sobremesas e pós para sobremesas de flans, pudins e similares	0,50 no p.s.c.
GOMA GUAR (E.P.VIII)	Coberturas e pós para cobertura de sobremesas	0,30 no p.s.c.
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis	0,50
	Condimentos preparados	0,75
	Conservas alimentícias para uso infantil	0,085 no p.s.c.
	Creme de leite esterilizado	0,50
	Creme vegetal	0,20
	Gelados comestíveis	0,50
	Gomas de mascar	0,50
	Ketchup	0,75
	Leite aromatizado	0,50
	Leite gelificado	0,50
	Molhos cremosos	0,75
	Molhos preparados	0,75
	Molhos ou líquidos gordurosos de cobertura para hortaliças em conservas e saladas	0,75 no p.s.c.
	Picles com molhos preparados	0,50
	Produtos de confeitaria	1,00
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,50 no p.s.c.
	Produtos de panificação	0,50 sobre o peso da farinha
	Picles com molhos preparados	0,50
	Queijos cremosos	0,50
	Recheios e revestimentos para produtos de confeitaria	0,50
	Sobremesas, pós para sobremesas de flans, pudins e similares	0,50 no p.s.c.
	Sopas e caldos concentrados	0,50 no p.s.c.
GOMA XANTANA (E.P.XIII)	Coberturas para saladas	0,25
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	0,50
	Creme de leite esterilizado	0,50
	Creme vegetal	0,50
	Gelados comestíveis	0,15
	Leites gelificados	0,50
	Molhos cremosos	1,00
	Produtos de confeitaria	1,00
	Produtos de cereais, frutas, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,50 no p.s.c.

	Queijos cremosos	0,50
	Recheios e coberturas de produtos de confeitaria	0,15
	Sobremesas e pós para sobremesas de flans, pudins e similares	0,20 no p.s.c.
	Sopas e caldos concentrados	0,30 no p.s.c.
MUSGO IRLANDÊS (CARRAGENANA FURCELARANA) (E.P.X)	Creme de leite esterilizado	0,50
	Coberturas e xaropes para gelados comestíveis e sobremesas	0,50
	Coberturas para saladas	0,50
	Gelados comestíveis	1,00
	Geleia de mocotó	0,50
	Leite aromatizado	0,50
	Leite evaporado	0,15
	Leite gelificado	0,50
	Molhos ou líquidos gordurosos de cobertura para hortaliças em conservas	1,00 no p.s.c.
	Produtos de confeitaria	1,00
	Pós para cobertura de bolos	0,50 no p.s.c.
	Produtos de frutas, cereais, legumes e outros ingredientes para uso em iogurtes, queijos tipo petit-suisse e similares	0,50 no p.s.c.
	Sobremesas e pós para sobremesa de gelatinas, flans, pudins e similares	0,50 no p.s.c.
	Sopas e caldos concentrados	0,50

No q.s.p. - no produto a ser consumido

q.s.p. - quantidade suficiente para obter o efeito desejado

ESTABILIZANTES

ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODEM SER ADICIONADOS	LIMITE MÁXIMO g/100 – g/100ml
ÁCIDO ALGÍNICO E SEUS SAIS DE AMÔNIO, CÁLCIO, SÓDIO E POTÁSSIO (ET.XXXVI)	Batidas	0,50
	Licores	0,50
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	0,50 no p.s.c.
ÁCIDO META TÁRTARICO (ET.XXXVII)	Vinhos	0,01
ÁGAR-ÁGAR (ET.XXXVIII)	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	0,50 no p.s.c.
	Refrescos e refrigerantes	0,50
AMIDOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS: ACETATO DE AMIDO (ET.XXXIII), ADIPATO DE DIAMIDO ACETILADO (ET.XXXV), AMIDO OXIDADO (ET.XXXIX), AMIDO TRATADO POR ÁCIDO (ET.XL), FOSFATO DE DIAMIDO FOSFATO (ET.XLI), FOSFATO DIAMIDO	Alimentos infantis esterilizados (somente fosfato de diamido fosfatado)	6,00
	Bebidas e pós para preparo de bebidas de cacau, coco, cereais, leite e malte	1,0 no p.s.c.
	Batidas	1,00
	Coberturas para saladas	1,00
	Coberturas e xaropes de produtos de confeitaria, de bolos e de gelados comestíveis	1,00
	Gelados comestíveis	3,00
	Hortaliças em conservas	1,00
	Molhos gordurosos	1,00
	Molhos gordurosos para saladas	1,00

ACETILADO (ET.XXXII)	Molhos ou líquidos gordurosos de cobertura para vegetais em conservas	1,00 (isoladamente ou em conjunto no produto a ser consumido)
	Refrescos e refrigerantes	1,00
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	1,00 no p.s.c
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	1,00 no p.s.c.
	Sopas e caldos concentrados	1,00 no p.s.c
ACETATO ISOBUTIRATO DE SACAROSE (SAIB) (ET.XXII)	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes que contenham emulsões e óleos essenciais críticos	0,05 no p.s.c
	Refrescos e refrigerantes que contenham óleos essenciais críticos	0,05
ALGINATO DE PROPILENO GLICOL (ET.XXVI)	Cervejas	0,007
	Coberturas e recheios de produtos de confeitaria, panificação e similares	0,50
	Coberturas para saladas	0,50
	Gelados comestíveis	0,50
	Hortaliças em conservas contendo, contendo molhos gordurosos, que sejam submetidos a tratamento térmico	0,80
	Leite de coco esterilizado	0,02
	Licores	1,00
	Mistura para produtos de panificação ou de confeitaria	0,50 no p.s.c.
	Molhos gordurosos	0,80 no p.s.c.
	Produtos de confeitaria	0,50
	Produtos de panificação	0,50 sobre o peso da farinha empregada
	Refrescos e refrigerantes contendo suco e polpa de fruta	0,25
	Sobremesas e pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,50 no p.s.c.
CARBOXIMETILCELULOSE E SEU SAL SÓDICO (ET.XLII)	Batidas	0,50
	Cooler	0,50
	Licores	0,50
	Néctares de frutas	0,50
	Sangria	0,50
	Suco de frutas	0,50
	Preparados sólidos e líquidos para refrescos e refrigerantes	0,50 no p.s.c.
	Refrescos e refrigerantes	0,50
CASEINATO DE SÓDIO (ET.V)	Conservas de carnes enlatados e cozidos (em substituição ao amido)	2,00
	Produtos de confeitaria	2,00
CELULOSE MICRO-CRISTALINA (ET.XX)	Coberturas e pós para cobertura de sobremesas	0,50 no p.s.c.
	Coberturas para saladas	0,50
	Creme de leite esterilizado	0,50
	Molhos cremosos	1,50
	Pós para cobertura de bolos	0,50 no p.s.c.
	Pós para sorvetes	0,50 no p.s.c.
	Preparados sólidos ou líquidos para refrescos	0,50 no p.s.c.
	Sobremesas, pós para sobremesas de gelatinas, flans, pudins e similares	0,50 no p.s.c.

CITRATO DE SÓDIO (ET.VI)	Creme de leite esterilizado	q.s.p.
	Doce de leite	0,05 sobre o volume do leite empregado
	Doces em pasta	q.s.p.
	Leites aromatizados e esterilizados	q.s.p.
	Leites esterilizados	q.s.p.
	Leite concentrado	0,10
	Leite evaporado	0,10
	Leites em pó	0,05
	Leites esterilizados	q.s.p.
	Mistura para bolos a base de farinha de trigo	q.s.p.
	Queijos fundidos	q.s.p.
	Requeijão cremoso	q.s.p.
	Sobremesas e pós para sobremesas de flans, pudins e similares	q.s.p.
	Sopas e caldos concentrados	q.s.p.
CITRATO DE TRIETILA (ET.XLIII)	Clara de ovo líquido, resfriado ou desidratado, para aerção, usada em recheios de bombons, suspiros, merengues, torrão e marshmallow	0,25 sobre o peso da clara de ovo (base seca)
CLORETO DE CÁLCIO (ET.XLIV)	Batatas	0,10
	Cenouras, ervilhas e demais vegetais	0,03
	Frutas cristalizadas e glaceadas	0,02
	Hortaliças em conservas submetidas a tratamento térmico	0,035
	Picles	0,030
	Pimentas doces	0,035
	Tomates inteiros (processados)	0,045
	Tomate sob outras formas	0,080
DIACETIL TARTARATO DE MONO E DIGLICE- RÍDEOS (ET.XXV)	Biscoitos e similares	0,50 sobre o peso da farinha empregada
	Gorduras e compostos gordurosos	0,50 no p.s.c.
	Margarinas	0,10
	Misturas para produtos de panificação e confeitaria	0,50 no p.s.c.
	Molhos e coberturas para saladas	0,30 no p.s.c.
	Produtos de panificação	0,50 sobre o peso da farinha empregada
ESTEARATO DE POLI- OXIETILENOGLICOL (8) (ET.XXIII)	Mistura para produtos de panificação e confeitaria	0,75 no p.s.c.
	Produtos de confeitaria	0,75 sobre o peso da farinha empregada
	Produtos de panificação	0,75 sobre o peso da farinha empregada
ESTEAROIL 2-LACTIL LACTATO DE CÁLCIO (ET.VII)	Farinhas panificáveis submetidas à fermentação biológica	0,50 sobre o peso da farinha empregada
	Gorduras e compostos gordurosos	0,30
	Mistura para produtos de panificação ou de confeitaria	0,50 sobre o peso da farinha
	Molhos e coberturas para saladas	0,25
	Pós para purê de raízes e tubérculos desidratados	0,50
	Produtos de confeitaria	0,50 no p.s.c.

No .p.s.c. - no produto a ser consumido

q.s.p. - quantidade suficiente para obter o efeito desejado

ANEXO B. Exemplo de metodologia básica utilizada para o SCGE (ensaio cometa).
Rojas *et al*, 1999.

