

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

Determinação dos níveis sanguíneos de frutose em recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional com 48 horas de vida

Rodrigo Crespo Barreiros

Botucatu, 2001

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

Determinação dos níveis sangüíneos de frutose em recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional com 48 horas de vida

Rodrigo Crespo Barreiros

Orientadora: Profa. Dra. Cleide Enoir Petean Trindade.

*Dissertação apresentada ao Programa
De Pós-graduação em Pediatria Área de
concentração em “Pediatria” da
Faculdade de Medicina de Botucatu
UNESP para a obtenção de título de
Mestre*

Botucatu, 2001

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ELZA NUMATA

Barreiros, Rodrigo Crespo

Determinação dos níveis sanguíneos de frutose em recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional com 48 horas de vida.

Dissertação (Pós-Graduação) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista 2001.

1. Frutose-dosagem 2. Cromatografia líquida de alta resolução

Palavras chave: frutose, sorbitol, glicose, HPLC, carboidratos, metabolismo e recém-nascido.

“Há verdadeiramente, duas coisas diferentes:

saber e crer que se sabe.

A ciência consiste em saber; em crer que se sabe

está a ignorância”.

Hipócrates

Dedicatória

Aos meus pais, Martina e Edmar, por todo o carinho, estímulo, apoio e exemplo que me deram ao longo de toda a minha formação.

Agradecimentos

Agradeço em especial,

À *Profa. Dra. Cleide Enoir Petean Trindade*, exemplo de mestre e pesquisadora, pelo apoio, disposição, sabedoria e paciência, incentivando-me e estimulando-me durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Este trabalho só chegou ao objetivo graças ao apoio e colaboração de muitas pessoas.

Agradeço em especial:

À *Profa. Dra. Rudecinda Crespo*, minha querida madrinha, pelo apoio e estímulo durante todo o percurso deste trabalho.

Ao *Prof. Dr. Luiz Ferraz de Sampaio Neto*, meu primo, pelo exemplo e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus irmãos, *Maria Fernanda, José Gustavo e João Henrique*, pelo carinho e apoio.

Ao *Prof. Dr. Antero Frederico Miranda*, pelo auxílio e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

À *Sra Neuza M. Ferreira*, pela dedicação e apoio no desenvolvimento do trabalho

À *Dra Grasiela Bossolan*, pela amizade e apoio fundamentais para o término deste projeto.

Às *Dras Alcinda A. Nigri e Celeste Sardinha Oshiro*, pela amizade e companheirismo durante todo o processo de desenvolvimento desta pesquisa.

Aos *Drs. Izilda Eiras Tâmega e José Inácio Pereira da Rocha*, pela amizade e paciência ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Aos *amigos Adriana de Fátima Bazo Tavares e Fabiano Luis Michelin*, pela colaboração e pelo apoio.

À minha querida prima, *Marina Wey*, pelo estímulo e apoio durante todo o período de desenvolvimento desta pesquisa.

Aos *funcionários do Laboratório experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu, Cristina, Paulo, Jovina e Regina*, pela simpatia com que me receberam e pelo apoio durante o preparo das amostras.

Aos *funcionários do Berçário da Faculdade de Medicina de Botucatu* pelo auxílio na coleta das amostras.

Ao *Jean J. Wey*, meu primo, pelo auxílio e incentivo.

À Sra. *Onélia Bossolan*, pelo apoio.

Aos *médicos e funcionários do Berçário e Maternidade do Hospital Regional Sorocabano* que permitiram a coleta de amostras neste hospital.

Aos *Professores do Programa de Pós-graduação em Pediatria*, pela contribuição para o meu desenvolvimento profissional.

Ao *Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani*, pelas orientações estatísticas.

Aos *funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP*, em especial à *Regina Célia Spadin, Vera Lúcia Aparecida Mengue, nathanael Pinheiro Salles e Lílian Cristina Nadal Bianchi Nunes*, pela orientação, apoio e paciência durante todo o desenvolvimento da tese.

Aos *funcionários, professores e alunos da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP*, pela simpatia e cordialidade com que me acolheram, o que tornou mais fácil e prazerosa a minha pesquisa.

À amiga *Ana Elisa Molletta* pelo apoio e ajuda no processo de diagramação deste trabalho.

Aos *funcionários da Biblioteca do Campus de Botucatu*, em especial à *Rosemary Cristina da Silva*, pelo auxílio e revisão das referências bibliográficas.

À *Faculdade de Medicina de Sorocaba, da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo e em especial à Cadeira de Pediatria*, pela minha formação e pelo estímulo e apoio importantes para o meu aprimoramento.

Sumário

Sumário.....	8
Lista de figuras.....	12
Lista de quadros e tabelas	13
Lista de abreviaturas e símbolos.....	14
Resumo.....	15
Summary.....	17
1. Introdução.....	19
1.1. Conceito de frutose.....	20
1.2. Conceito de sorbitol	22
1.3. Fontes de frutose e sorbitol	23
1.4. Ingestão diária de frutose e sorbitol	25
1.5. Metabolismo da frutose e do sorbitol	26
1.5.1. Absorção intestinal	26
1.5.2. Transporte para o fígado	28
1.5.3. Metabolismo hepático da frutose e do sorbitol	29
1.5.4. Outros tecidos envolvidos com o metabolismo da frutose e do sorbitol	33
1.5.5. Efeitos metabólicos da frutose e do sorbitol	34

1.6. Metabolismo da frutose e sorbitol no feto e recém-nascido.....	36
1.6.1. Metabolismo placentário.....	36
1.6.2. Metabolismo neonatal.....	38
1.7. Utilização clínica da frutose e sorbitol.....	39
1.8. Frutose, sorbitol e erros inatos	42
1.8.1. Frutosúria essencial.....	42
1.8.2. Intolerância hereditária à frutose	43
1.8.3. Deficiência de 1,6- difosfatase4.....	44
2. Objetivos.....	46
2.1. Geral.....	47
2.2. Específicos	47
3. Casuística e métodos	48
3.1. Tipo de estudo	49
3.2. Seleção da casuística.....	49
3.3. Seleção dos recém-nascidos.....	50
3.4. Critérios de inclusão	50
3.5. Critérios de exclusão	51
3.6. Procedimentos com os recém-nascidos	51
3.7. Coleta das amostras.....	52
3.8. Método para a determinação da frutose no sangue	53
3.8.1. Cromatografia líquida de alta resolução	53
3.8.2. Cromatógrafo utilizado na análise das amostras.....	54
3.8.3. Determinação da frutose nas amostras	55
3.8.3.1. Preparo da amostra	55
3.8.3.2. Recuperação da amostra	55
3.9. Análise estatística.....	56

4. Resultados.....	57
4.1. Resultados referentes ao método.....	58
4.1.1. Recuperação da amostra	58
4.1.2. Correlação entre o padrão interno e os níveis de frutose e glicose dos recém-nascidos	59
4.1.3. Resultados referentes à curva padrão das variáveis bioquímicas no HPLC	60
4.2. Resultados referentes aos recém-nascidos.....	62
4.2.1. Características da população de recém-nascidos	62
4.3. Relação entre as variáveis bioquímicas dos recém-nascidos.....	64
5. Discussão	65
5.1. Método.....	66
5.1.1. Cromatografia líquida de alta resolução	66
5.1.2. Coleta e preparo das amostras.....	67
5.1.3. Padrão interno das amostras.....	68
5.1.4. Fase móvel	68
5.1.5. Tipo de coluna	68
5.1.6. Tipo de detector.....	68
5.2. Resultados da investigação.....	69
5.2.1. Considerações iniciais	69
5.2.2. Concentrações de frutose no sangue	70
5.2.3. Concentrações sangüíneas de sorbitol.....	72
5.2.4. Concentrações sangüíneas de glicose	73
5.2.5. Papel da frutose em humanos	74
5.3. Relação frutose-sorbitol.....	77
5.4. Considerações finais	77
6. Conclusões	78
7. Referências bibliográficas.....	80
8. Anexos.....	89

Lista de Figuras

Figura 1	Fórmula estrutural da frutose.....	21
Figura 2	Fórmula estrutural do sorbitol	22
Figura 3	Transportador de frutose	27
Figura 4	Esquema de transporte de frutose através do enterócito	28
Figura 5	Vias metabólicas da frutose e do sorbitol	32
Figura 6	Controle do metabolismo da frutose	33
Figura 7	Valor médio dos níveis sanguíneos de glicose	63
Figura 8	Valores médios dos níveis sanguíneos de frutose e sorbitol	63
Figura 9	Relação entre os níveis sanguíneos de frutose e sorbitol	64
Figura 10	Óxido-redução do sorbitol e da frutose e inter-relação com a glicólise.....	76

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1	Ocorrência de açúcares e sorbitol em alguns alimentos.....	24
Quadro 2	Relatos de concentrações normais de frutose no plasma e soro humano	71
Tabela 1	Relação entre a percentagem de recuperação do manitol da amostra, com os níveis de glicose, frutose e sorbitol no sangue de recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional.	58
Tabela 2	Valor do manitol injetado, manitol recuperado e porcentagem da recuperação de cada amostra.....	59
Tabela 3	Características descritivas gerais dos recém-nascidos.....	62
Tabela 4	Características descritivas gerais das variáveis bioquímicas dos recém-nascidos.	63
Tabela 5	Coefficiente de correlação de Pearson para variáveis bioquímicas dos recém-nascidos.	64

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AMP _c	Adenosina monofosfato cíclico
ADP	Adenosina di-fosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
C	Carbono
Ca ⁺⁺	Cálcio
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
GLUT	Proteína transportadora de açúcar
H ⁺	Hidrogênio
Na ⁺	Sódio
NAD ⁺	Nicotinamida adenosina di-nucleotídeo (oxidada)
NADH	Nicotinamida adenosina di-nucleotídeo (reduzida)
NADP ⁺	Nicotinamida adenosina di-nucleotídeo fosfato (oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenosina di-nucleotídeo (reduzida)
O	Oxigênio
P	Fósforo
pH	Logaritmo negativo da concentração de hidrogênio, em moléculas-grama por litro de solução
UDPG	Uridina di-fosfato glicose
UTP	Uridina tri-fosfato

Resumo

Barreiros, R.C. **Determinação dos níveis sanguíneos de frutose em recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional com 48 horas de vida.**

O metabolismo da frutose, bem como o seu nível sanguíneo em recém-nascidos não está bem esclarecido. A frutose é uma hexose encontrada normalmente no organismo humano e tem seu metabolismo associado à glicose e ao sorbitol. As principais fontes de frutose são os vegetais e o mel. O leite materno não contém frutose. O metabolismo desse açúcar é independente da insulina o que o torna uma boa opção para utilização em pacientes com deficiência desse hormônio. Além da independência da insulina, o metabolismo da frutose é caracterizado por uma rápida fosforilação e rápida conversão em glicogênio e glicose ou conversão em glicerol, para posterior utilização no metabolismo lipídico. A frutose pode ser produzida endogenamente, a partir da glicose, através da via do sorbitol.

Apesar de ser utilizado há tempos clinicamente como uma alternativa à glicose, existem poucos trabalhos na literatura determinando os níveis normais em humanos. Isso ocorreu em grande parte devidas dificuldades na dosagem desse carboidrato: em virtude de ser difícil a sua diferenciação da glicose, outra hexose, além da frutose ser encontrada em pouca quantidade em fluídos orgânicos.

Foi nosso objetivo determinar os valores normais de frutose em recém-nascidos a termo com pesos adequados para a idade gestacional, sob aleitamento materno exclusivo e relacioná-los com os valores encontrados de glicose e sorbitol. Para a dosagem desses carboidratos utilizamos a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), determinando a sua eficácia com volumes reduzidos de sangue e baixas concentrações de frutose. Nossa casuística constitui-se de 30 recém-nascidos a termo, de parto normal, sem intercorrências, com score de Apgar maior ou igual a 7, sem doença e sob aleitamento materno exclusivo. As amostras foram colhidas com 48 horas de vida, 30 minutos após o início da mamada. Os recém-nascidos foram pesados antes e após as mamadas. A técnica utilizada foi o método de Hu et al. (1995), com modificações. Os recém-nascidos apresentavam idade gestacional média de 278 dias ($\pm 8,09$), com limites extremos de 266 e 293 dias. O peso de nascimento médio foi de 3.246,33g ($\pm 314,47$), com limites extremos de 2630g a 3805g. Em relação aos valores bioquímicos a média dos níveis sanguíneos de glicose foi de 55,44mg/dl ($\pm 10,10$), com limites extremos de 36,88mg/dl e 80,07mg/dl. A média dos níveis sanguíneos de frutose foi de 3,67mg/dl ($\pm 0,93$), com limites extremos de 1,85mg/dl e 5,29mg/dl. Os valores médios de sorbitol foram de 1,69mg/dl ($\pm 0,84$), com limites extremos de 0,22mg/dl e 3,25mg/dl. Houve relação entre os valores de frutose e sorbitol, com $r = 0,52$ e $p < 0,01$. Os valores sanguíneos encontrados estão próximos daqueles encontrados na literatura e a correlação significativa encontrada entre os níveis sanguíneos de frutose e sorbitol sugere a inter-relação entre os seus metabolismos.

Concluimos que a cromatografia líquida de alta resolução revelou-se um método eficaz para a determinação da frutose em sangue de recém-nascidos. Sugerimos que a presença de frutose no sangue de recém-nascidos, que é originário, provavelmente, da glicose, via sorbitol, é importante para a produção de co-fatores, NADH e NADP, que serão utilizados nos processos celulares de óxido-redução além de produção de precursores fosforilados para a síntese de ácidos graxos.

Summary

Barreiros, R.C. **Blood-Fructose levels in full-term newborn at 48 hours after birth.**

The metabolism of fructose as well the blood-levels of fructose in newborn infants are not yet well established. Fructose is an hexose found naturally in fruits, vegetables and honey and its metabolism is associated with glucose and sorbitol. The human milk does not contain fructose. The metabolism of fructose is insulin independent, which makes it an alternative to glucose. Besides its independence of insulin, fructose is rapidly metabolized primarily in the liver, where occurs phosphorylation and conversion to glycogen and glucose or to glycerol, to further utilization in lipid metabolism. Fructose, also, can be produced by the human organism, originating from glucose by the sorbitol pathway.

Although fructose is utilized since 1893 for medical purposes, there are few studies in the literature about normal levels of fructose in humans. This lack of studies is due in part to difficulties to determine this sugar in human fluids: glucose interferes in the final results and levels of fructose in biological fluids are very low.

Our main goal was to establish the normal levels of fructose in newborn infants at 48 hours of life, with adequate weight for gestational age, breast-fed exclusively and to correlate the level of fructose with the levels of glucose and sorbitol. For this purpose we used the High performance liquid chromatography was used. Our study group was selected among breast-fed term newborn infants with adequate weight for gestational age, delivered naturally , without diseases, and to correlate the levels of fructose with glucose and sorbitol.

The Apgar score should be 7 or higher. The study group was formed by 30 newborn infants. The blood samples were collected at 48 hours after delivery, 30 minutes after the newborn was fed. They were weighed before and after the breast feeding. It was used the method of Hu et al. (1995) with modifications. The mean gestational age was 278 days (± 8.09), with extreme limits of 266 and 293 days. The mean weight was 3.246 g (± 314), with extreme limits of 2630 and 3805g. The biochemical values were, for glucose, mean \pm SD 55.44mg/dl (± 10.10), with the extreme values of 36.88mg/dl and 80.07mg/dl. The mean values for fructose was 3.67mg/dl (± 0.93), with the extreme values of 1.85mg/dl and 5.29mg/dl. The mean level of sorbitol was 1.69mg/dl (± 0.84), with the limits of 0.22 and 3.25mg/dl. There was a significant correlation between fructose and sorbitol, with a $r = 0.38$ and $p < 0.01$. A significant correlation between sorbitol and fructose confirms the relation-ship among this two metabolisms.

It was concluded that HPLC is a sensitive method to determine fructose in the blood of newborn infants. It was suggested that the fructose in the blood of the newborn babies probably is provided by glucose through the pathway of sorbitol. This pathway is important to produce NADH and NADP to maintain the redox potential of cells and to provide phosphate precursors for free fatty acids synthesis.

1. Introdução

1.1. Conceito de frutose

O termo frutose deriva do latim “fructus”, que significa fruta. As frutas são uma boa fonte dessa substância, também chamada de açúcar das frutas.

Açúcar é uma substância orgânica de sabor doce. A palavra açúcar deriva do sânscrito çarkara, que significa grão de areia. Dessa palavra surgiram o grego sákkharon e o latim saccharum e o árabe súkkar. O termo açúcar deriva do árabe, e surgiu no século XIII (Enciclopédia Mirador, 1976).

Açúcar é um carboidrato. Carboidratos formam um vasto grupo de substâncias que têm em sua composição carbono, hidrogênio e oxigênio na proporção de C:H:O de 1:2:1. São as biomoléculas mais abundantes da superfície terrestre. Alguns carboidratos, como o açúcar e o amido são a base da nutrição humana (Lehninger et al., 1995).

A oxidação dos carboidratos é a principal via metabólica produtora de energia para a maioria das células não-fotossintéticas. Polímeros de carboidratos funcionam como elementos estruturais e de proteção nas paredes celulares. A hidrólise dos carboidratos libera aldeídos ou cetonas (Lehninger et al., 1995).

Os carboidratos podem ser classificados, de acordo com seu tamanho, em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos, também chamados de açúcares simples, são compostos de apenas uma unidade de poliidroxialdeído ou poliidroxicetona. Os oligossacarídeos consistem de cadeias curtas de monossacarídeos. Os polissacarídeos são compostos por centenas ou milhares de cadeias de monossacarídeos (Lehninger et al., 1995).

Os monossacarídeos são compostos sólidos, sem cor, cristalinos, livremente solúveis na água e a maioria tem sabor adocicado. A estrutura dos monossacarídeos é composta por uma cadeia carbônica não-ramificada, na qual todos os átomos de carbono estão unidos por ligações covalentes simples. Um dos átomos de carbono está unido por uma dupla ligação com um átomo de oxigênio, formando um grupo carbonila. Cada um dos outros átomos de carbono está unido a átomos de hidrogênio, formando grupamentos hidroxila. A posição do grupo carbonila na molécula do monossacarídeo determinará se ele fornecerá cetona ou aldeído quando hidrolisado. Se o grupamento carbonila está situado numa das extremidades da cadeia carbônica, fornecerá, quando hidrolisado, aldeído, sendo chamado de aldose. A glicose é um exemplo de aldose. Caso o grupamento carbonila esteja situado em qualquer posição que não as extremidades, fornecerá cetona quando hidrolisado, sendo a substância chamada de cetose. A frutose é um exemplo de cetose (Figura 1) (Lehninger et al., 1995).

Os monossacarídeos com seis átomos de carbono em sua molécula são chamados de hexoses. As hexoses são os monossacarídeos mais comuns na natureza. As duas principais são a glicose e a frutose.

A frutose pode ser encontrada isolada na natureza (D-frutose), associada à glicose, formando a sacarose (β -D-frutofuranosil α -D-glicopiranosida), e também formando polímeros (chamados de fructans ou inulina) (Rumessen, 1992).

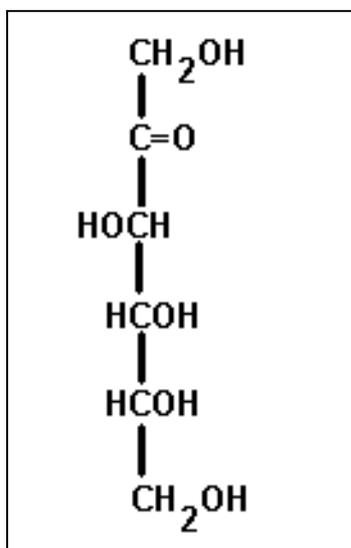


Figura 1. Fórmula estrutural de D-frutose

1.2. Conceito de sorbitol

Sorbitol ou D-glucitol é um poliálcool-açúcar. Ele é um álcool hexavalente obtido da sorveira (*Couma guianensis*, *C. macrocarpa* e *C. utilis*). Polióis são álcoois polihídricos, isto é, que derivam de açúcar com mais de um grupamento hidroxila na sua estrutura química. Eles são derivados de carboidratos nos quais o grupo carbonila foi reduzido ou hidrogenado para um grupamento hidroxila secundário ou primário (Figura 2).

Os polióis são produtos da redução de aldoses e cetoses. As concentrações de polióis nos vários tecidos refletem o metabolismo dos carboidratos (Yoshioka et al., 1984).

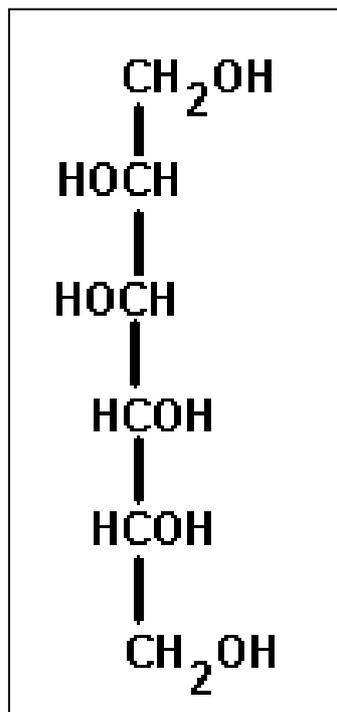


Figura 2. Fórmula estrutural do D-Sorbitol

1.3. Fontes de frutose e de sorbitol

A frutose é o monossacarídeo predominante em várias frutas, incluindo maçãs, laranjas e melões. Vegetais podem conter de 1 a 2% de frutose livre e mais 3% de frutose na forma de sacarose (Hallfrish, 1990).

A Inulina é um polímero de frutose presente na chicória, batata-doce e alcachofra de Jerusalém. A frutose pode ainda aparecer na forma da rafinose, que é um trissacarídeo, e como estaquinose, que é um tetrassacarídeo, e sob essas formas ser encontrada em alguns legumes. Essas formas não são absorvidas pelo intestino humano, porém são fermentadas por bactérias no intestino grosso e podem ser a fonte de gases que acompanham a ingestão de alguns legumes (Hallfrish, 1990).

Em decorrência de algumas propriedades como a maior solubilidade em soluções aquosas, e por ser mais doce (cerca de 1,7 vezes mais que a sacarose), a frutose vem sendo empregada como adoçante de bebidas e frutas enlatadas. Frutas e bebidas enlatadas contêm de 4 a 8% de frutose. Alimentos produzidos em confeitarias têm, em média, 1 a 2% de frutose, porém se esses alimentos são compostos por frutas a quantidade de frutose aumenta para 11% (Hallfrish, 1990).

O mel fornece a maior concentração de frutose (42,4% do peso) como um adoçante natural (Hallfrish, 1990).

O sorbitol está presente em várias plantas, em particular na família Rosácea (maçãs, pêras, cerejas, ameixas e abricô), geralmente associada à frutose. Outras fontes onde o sorbitol pode ser encontrado incluem doces, balas de menta, goma de mascar e alimentos e sucos dietéticos. Alguns produtos para diabéticos, como geléias e chocolates podem conter uma quantidade considerável de sorbitol (Rumessen, 1992).

Quadro 1. Ocorrência de açúcares simples e sorbitol em alguns alimentos (em g/100g):

Alimento	Frutose	Glicose	Sacarose	Sorbitol
Frutas:				
Maçã	6 - 8	1 - 4	1 - 5	0,2 - 1
Suco de maçã	6 - 8	1 - 4	4	0,3 - 1
Banana	2 - 4	3 - 6	6 - 14	?
Cereja	5 - 7	5 - 7	0,2	1,4 - 2,1
Uva	5 - 7	5 - 7	0,5	0,2
Laranja	2 - 3	2 - 3	4 - 7	-
Suco de laranja	2 - 6	2 - 6	2 - 4	-
Pêra	5 - 9	1 - 2	1 - 2	1,2 - 3,5
Suco de pêra	5 - 9	1 - 2	1 - 2	1,1 - 2,6
Ameixa	1 - 4	2 - 5	1 - 5	0,3 - 2,8
Morango	1 - 3	1 - 3	1 - 2	< 0,1
Melão	2 - 4	1 - 2	1 - 5	1 - 5
Tomate	1 - 1,5	1 - 1,5	< 0,1	< 0,1
Mel	41	34	2	-
Legumes e vegetais:				
Aspargos	1,4	1,0	0,3	-
Feijão	1 - 1,5	0,5-1	0,6	-
Repolho	1,6	1,7	0,4	-
Cenoura	1,0	1,0	4,0	-
Alho	1,5	1,0	1 - 1,5	-
Alface	0,6	0,5	0,1	-
Cebola	1,0	2,0	1,0	-
Ervilha	< 0,1	< 0,1	1 - 5	-
Batata	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-

(modificado de Rumessen, 1992).

1.4. Ingestão diária de frutose e sorbitol

Na dieta humana ocidental, carboidratos correspondem a 200-300g/dia ou 40 a 50% das calorias ingeridas. A ingestão diária de frutose livre (excluindo sacarose) é de 16g/dia, com um percentil 90 de 31g/dia. Caso haja ingestão de xaropes de milho ricos em frutose, o consumo de frutose pode atingir 60-100g/dia. Um total de 150g/dia de frutose pode ser atingida se somarmos a frutose originária da sacarose. Em termos de calorias, o consumo de frutose corresponde a 20% do total (Rumessen, 1992) Um grama de frutose assim como de glicose fornece 16kJ de energia (Uusitupa, 1994).

O consumo per capita de sorbitol é de cerca de 200 mg/dia (Wang & van Eys, 1981).

1.5. Metabolismo da frutose e do sorbitol

1.5.1. Absorção intestinal

A maioria dos carboidratos da dieta é hidrolisada até monossacarídeos como a glicose, galactose e frutose, pela ação das glicosidases que existem na membrana dos enterócitos das microvilosidades. O enterócito é uma célula polarizada, que possui uma membrana com borda em escova em contato com o lúmen e uma membrana basolateral em contato com o suprimento sanguíneo.

A frutose é absorvida através de dois mecanismos distintos de transporte, sendo o primeiro um transporte facilitado independente da glicose, com baixa capacidade e o segundo um co-transporte dependente de glicose, com alta capacidade (Perman, 1996).

Quando ofertada como frutose livre, este açúcar difunde-se através do intestino delgado mais eficientemente do que os açúcares transportados passivamente, como o sorbitol. Este processo é chamado de difusão facilitada. A adição de glicose estimula a absorção de frutose de uma maneira dose dependente e isso parece complementar o transporte pelo nível de saturação de frutose. Esse último tipo de mecanismo de transporte é considerado ativo, isto é, contra um gradiente de concentração sendo o carreador diferente daquele de glicose e galactose, e independente do sódio (Perman, 1996).

A difusão facilitada de glicose através da membrana plasmática celular é mediada por proteínas, que compõem a família de transportadores de glicose (GLUT) (Figura 3). Seis isoformas foram identificadas. Elas possuem diferenças cinéticas e especificidade de substrato. A presença de cada subtipo é determinada pelas necessidades de cada tecido. GLUT5 é o transportador da frutose (Buchs et al., 1998).

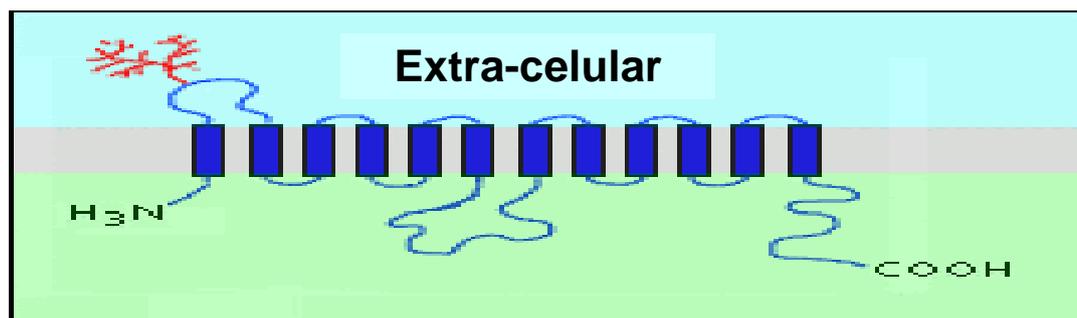


Figura 3. Transportador de hexoses (adaptada de Augsten & Bowen, 1999).

Esses transportadores são específicos para os açúcares e não estão associados a consumo de energia, tais como a hidrólise do ATP ou gradiente H^+ (Gould & Holman, 1993).

O GLUT5 é uma proteína que se localiza na porção apical da borda em escova no lado luminal dos enterócitos epiteliais. O GLUT5 é um transportador com alta afinidade pela frutose e pouca afinidade pela glicose. Seu papel primário é o de absorver a frutose da dieta. O GLUT5 não depende da estimulação pela insulina (Gould & Holman, 1993).

Estudos recentes feitos por Shi e colaboradores, em 1997, sugerem que a absorção da frutose aumenta quando ela é ingerida na forma de sacarose ou quando misturada com glicose. A hipótese é que quando a glicose é absorvida, ocorre uma abertura de pequenas junções e, portanto há movimento de fluido luminal através de uma via paracelular. Com esse movimento, pequenos solutos, incluindo a frutose mover-se-iam passivamente. Há um aumento de 29% da absorção da frutose quando associada a soluções com glicose (Shi et al., 1997).

O sorbitol pode interferir na absorção da frutose, inibindo-a (Hallfrisch, 1990).

O sorbitol é incompletamente absorvido, numa velocidade mais lenta que a frutose. Além disso, quando oferecidos simultaneamente, a frutose e o sorbitol competem pela absorção (Hoekstra & van den Aker, 1996).

Acredita-se que a absorção do sorbitol no intestino humano seja passiva e a capacidade de absorção do sorbitol pelo intestino é dependente de sua concentração. Em um estudo feito por Rumessen & Gudmand-Hoyer em 1987, foi observado que o sorbitol só interfere na absorção da frutose quando a frutose é ingerida como monossacarídeo, mas não quando ingerida sob a forma de sacarose. Isso pode ser explicado pela interferência do sorbitol apenas na difusão facilitada da frutose. Isso seria decorrente da conversão de sorbitol em frutose (Herman et al., 1972).

1.5.2. Transporte para o fígado

A frutose sai do enterócito transportada através da membrana basolateral. Esse transporte é feito através da proteína facilitadora de transporte de hexoses GLUT2, que está situada na membrana basolateral do enterócito (Corpe et al., 1999) (Figura 4).

Após sua absorção pela célula epitelial, a frutose difunde-se até a porção basal e penetra no sangue da veia porta sendo transportada até o fígado (Hallfrisch, 1990).

O sorbitol é metabolizado nos mesmos tecidos que a frutose, tendo o fígado como local principal (Sestoff, 1985).

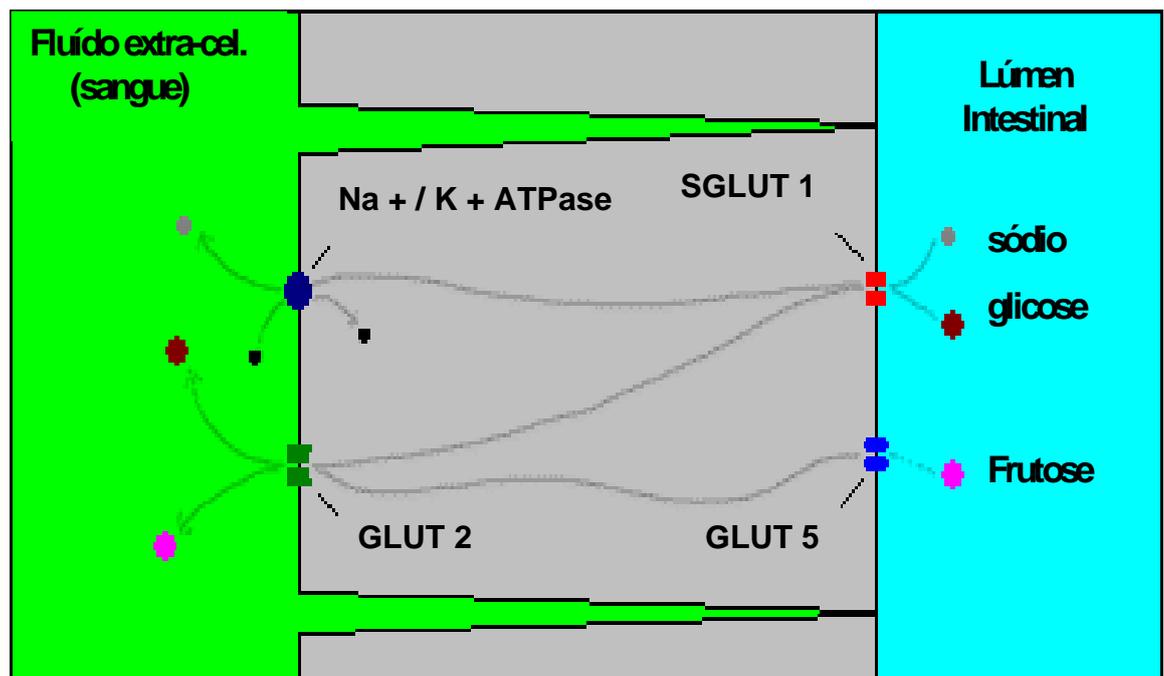


Figura 4. Esquema do transporte de Frutose através do enterócito (adaptada de Augsten & Bowen, 1999).

1.5.3. Metabolismo hepático da frutose e do sorbitol

A frutose que chega ao fígado atravessa a membrana plasmática do hepatócito através de um mecanismo de transporte específico. Esse mecanismo de transporte não é ativo, tratando-se de um mecanismo de difusão facilitada (Baur & Heldt, 1977).

Identificou-se um co-transportador da frutose no fígado, o GLUT2, que é encontrado em grande número na membrana plasmática do hepatócito. Ele também está presente nas células β do pâncreas, na superfície baso-lateral dos rins e no epitélio do intestino delgado (Gould & Holman, 1993).

O passo inicial no metabolismo da frutose (Figura 5) é a sua fosforilação. No interior do hepatócito a frutose é fosforilada pela hexoquinase, que se encontra distribuída na maioria dos tecidos, resultando na frutose-6-fosfato. A frutoquinase, enzima encontrada principalmente no fígado, fosforila o carbono na posição 1, resultando na frutose-1-fosfato (Figura 5). O aumento da frutose na dieta resulta em aumento na atividade da frutoquinase (Hallfrisch, 1990).

O sorbitol, que entra no metabolismo hepático através da oxidação pela desidrogenase dependente de NAD é metabolizado pelas mesmas vias que a frutose. A desidrogenação inicial no metabolismo do sorbitol é acompanhada por um aumento da relação NADH/NAD (Sestoff, 1985).

A velocidade da fosforilação da frutose é determinada pela sua concentração no sangue (Froesch, 1976). A glicose inibe a fosforilação da frutose pela hexoquinase, pois a hexoquinase tem uma afinidade vinte vezes maior pela glicose em relação à frutose (Hallfrisch, 1990). Tanto a entrada da frutose na célula hepática quanto a sua fosforilação são independentes de hormônios (Froesch, 1976).

A frutose-1-fosfato é rapidamente quebrada em fosfato de diidroxiacetona e gliceraldeído numa reação mediada pela aldolase frutose-1-fosfato. Um aumento de frutose na dieta leva a um aumento da atividade dessa enzima (Hallfrisch, 1990).

As duas trioses formadas podem, cada uma, seguir 3 caminhos (Figura 5)

1. O fosfato de diidroxiacetona pode ser isomerizado a gliceraldeído-fosfato e continuar através da via glicolítica até fornecer piruvato, o qual pode ser convertido tanto em ácido láctico, sob condições anaeróbicas ou entrar no ciclo do ácido cítrico como acetil CoA sob condições aeróbicas. O acetil CoA pode tanto participar da produção de energia, através da via respiratória ou participar da síntese de ácidos graxos (Hallfrisch, 1990).
2. O fosfato de diidroxiacetona pode ser reduzido a glicerol-3-fosfato e fornecer estrutura de glicerol para a síntese de triacilgliceróis, fosfolípidos e outros lipídeos (Hallfrisch, 1990).
3. O fosfato de diidroxiacetona pode também ser condensado com gliceraldeído-3-fosfato pela aldolase e formar frutose-1,6-difosfato e a partir desta, formar glicose ou glicogênio. A deposição de glicogênio é maior em animais com infusão de frutose quando comparado com a infusão de glicose (Hallfrisch, 1990).

O gliceraldeído formado pela clivagem da frutose-1-fosfato também tem três vias metabólicas (Figura 5)

1. Pode ser fosforilado pela trioquinase e após a sua fosforilação, o fosfato de gliceraldeído pode continuar pela glicólise ou ser usado na gliconeogênese ou armazenamento de glicogênio (Hallfrisch, 1990).
2. O gliceraldeído pode ser convertido a glicerato e então entrar na glicólise após a fosforilação a glicerato-2-fosfato.
3. O gliceraldeído pode ser reduzido a glicerol pela ação da aldose redutase. O glicerol pode ser fosforilado e formar um componente dos triacilgliceróis e outros componentes de lipídeos ou ser convertido a fosfato de diidroxiacetona, portanto mais frutose é convertida a lipídio do que a glicose (Hallfrisch J, 1990).

O controle do metabolismo da frutose (Figura 6)

A frutose-2,6-difosfato é um composto fundamental no controle do metabolismo da frutose e do metabolismo de carboidratos em geral. Trata-se de uma substância que está amplamente distribuída. A quantidade desse composto é regulada por um complexo enzimático formado pela frutose-6P, 2quinase / frutose-2,6-difosfatase. O controle é atingido pela fosforilação / desfosforilação desse complexo enzimático. Assim, quando energia é necessária, os carboidratos são metabolizados pela via glicolítica, porém em condições anabólicas a gliconeogênese predomina (Van Schaftingen, 1987).

O complexo enzimático frutose-6P, 2quinase / frutose-2,6-difosfatase é bifuncional, e cataliza a síntese e degradação da frutose-2,6-difosfato, que é o mais potente ativador da fosfofrutoquinase (Mizuguchi, 1999).

O nível de frutose-2,6-difosfato parece afetar a atividade de duas importantes enzimas reguladoras do metabolismo de carboidratos: a fosfofruto quinase-1,6 e a frutose-1,6-difosfatase. O AMP_C estimula a frutose-2,6-difosfatase, que forma então a frutose-6-fosfato, diminuindo o nível de frutose-2,6-difosfato. Essa diminuição estimula a frutose-1,6-difosfatase, que favorece a conversão de frutose-1,6-difosfato em frutose-6 fosfato, um intermediário da gliconeogênese. Em contraste, um aumento de frutose-2,6-difosfato estimula a fosfofruto quinase-1,6 a qual converte frutose-6-fosfato em frutose-1,6-difosfato, que favorece a glicólise (Van Schaftingen, 1987).

A frutose-2,6-difosfato foi encontrada no fígado, músculo, intestino e pâncreas. O efeito da frutose da dieta nos níveis de frutose-2,6-difosfato não foi ainda determinado (Hallfrisch, 1990).

Produção de frutose

A frutose pode ainda ser produzida a partir do sorbitol (via do Sorbitol) que é composta de 2 reações através das quais a forma não fosforilada da glicose é convertida em frutose com o sorbitol como intermediário. A primeira reação necessita de aldose redutase e oxida NADPH, enquanto a segunda reação reduz NAD⁺ e depende da cetose-redutase (Figura 5) (Brachet, 1973).

A transformação do sorbitol em frutose leva ao aumento da relação NADH/NAD. Isso empurra o fosfato de diidroxiacetona para o glicerol 3 fosfato em direção a redução do glicerol 3 fosfato. Por isso o metabolismo do sorbitol é acompanhado não somente por acumulação de frutose-1P, porém também pelo acúmulo de glicerol-3P e redução citosólica do nível de NAD redox. (Sestoff, 1985).

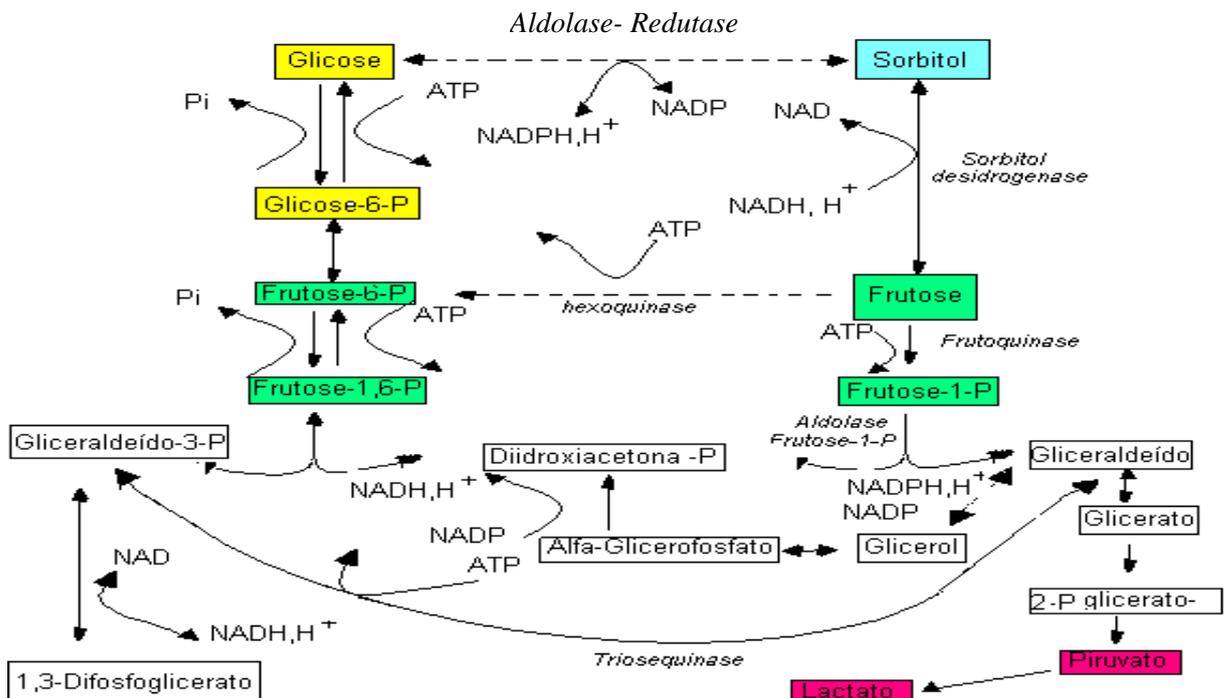


Figura 5. Vias metabólicas da frutose e do sorbitol (adaptada de Froesch, 1976)

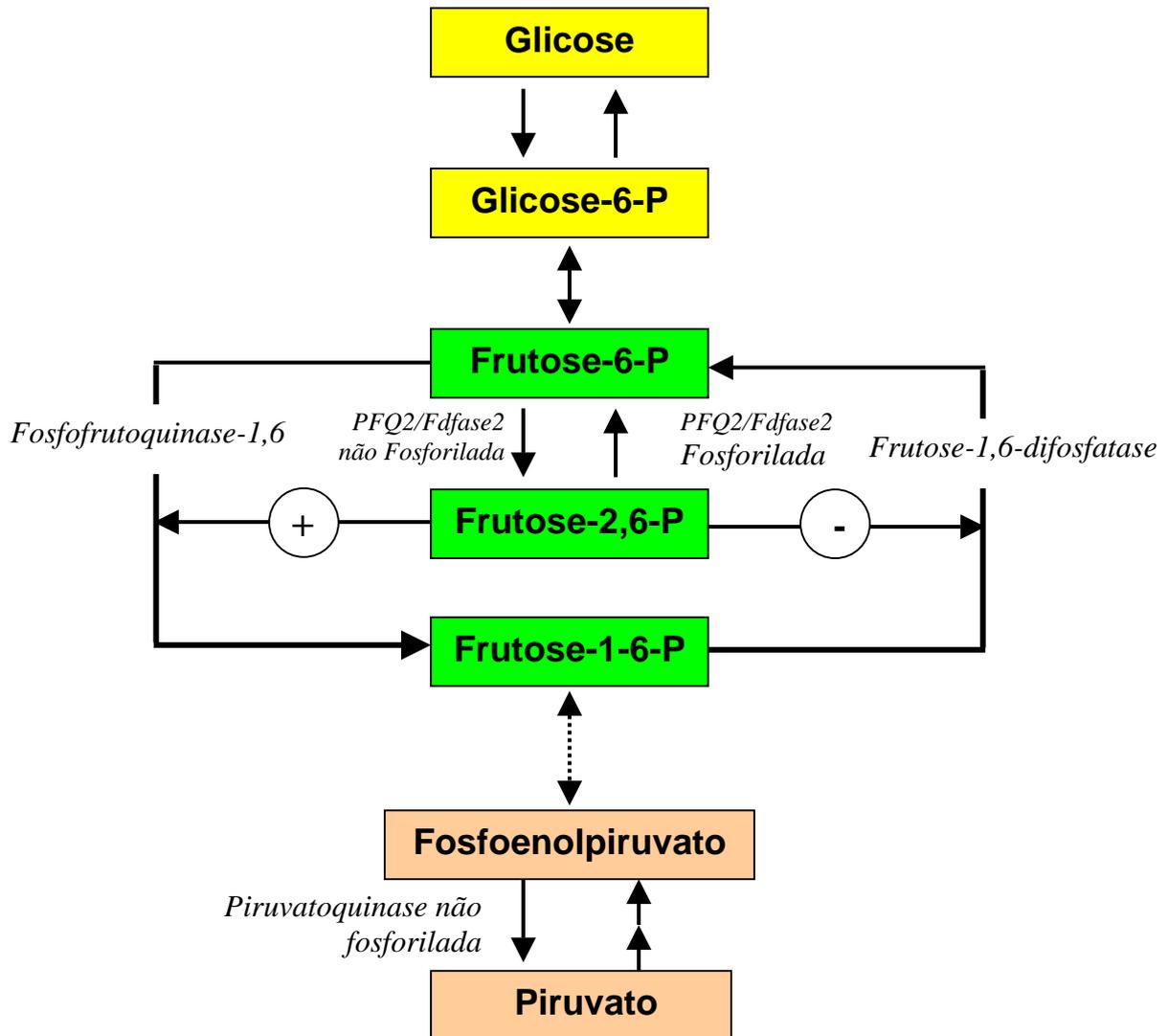


Figura 6. Controle do metabolismo da frutose (adaptada de Van Schaftingen, 1987).

1.5.4. Outros tecidos envolvidos com o metabolismo da frutose e do sorbitol

A frutose é metabolizada com maior intensidade no fígado, nos rins, pulmões e intestinos, porém quando absorvida pela via oral o fígado é o principal local de metabolismo. Em outros órgãos, como o tecido adiposo, músculo esquelético, cérebro, eritrócitos e coração a velocidade de metabolismo é muito pequena. Isso acontece porque nesses órgãos a enzima responsável pela fosforilação inicial é a hexoquinase que tem uma afinidade muito maior pela glicose quando comparada com a frutose (Sestoff, 1985).

O sorbitol é metabolizado nos mesmos locais que a frutose, tendo o fígado como principal local de metabolismo (Sestoff, 1985).

O co-transportador específico da frutose, GLUT5, é encontrado em uma série de tecidos, incluindo músculos (soleus, reto abdominal, psoas maior e vasto lateral), tecido cerebral e tecido adiposo (Gould & Holman, 1993).

O eritrócito expressa o GLUT5. O primeiro passo na metabolização da frutose nos eritrócitos é a sua fosforilação, mediada pela hexoquinase (Concha et al., 1997).

A frutose não é somente metabolizada pelo fígado humano, ela pode ser também sintetizada a partir da glicose em alguns tecidos. Os espermatozoides vivem em um meio de frutose, a qual é produzida pela próstata e vesícula seminal. A via metabólica inclui as enzimas aldolase redutase e sorbitol desidrogenase. Isso também pode ocorrer no fígado, tecido nervoso, vasos sanguíneos e músculo (Froesch, 1976).

A via do sorbitol foi identificada em uma grande variedade de tecidos de plantas e de animais e em algumas estruturas vasculares tais como as paredes das grandes artérias (Clements et al., 1969).

1.5.5. Efeitos metabólicos da frutose e do sorbitol

Em estudo feito por Reiser e colaboradores (1989), a inclusão de frutose na dieta de homens não hiperinsulinêmicos resultou em menores concentrações pós-prandiais de glicose e insulina, sem nenhum outro efeito indesejável. Entretanto, os efeitos benéficos da frutose nos índices de tolerância da glicose devem ser comparados com os efeitos indesejáveis da frutose em relação a um aumento dos fatores de risco para doença cardíaca, tais como os níveis mais elevados de lipídeos sanguíneos, colesterol e ácido úrico (Reiser et al., 1989).

Muitos estudos, tanto em animais quanto em seres humanos, mostram aumento nos triglicérides após a ingestão de dietas contendo frutose quando comparado com dietas com carboidratos mais complexos e outros açúcares. O consumo de frutose favorece a síntese de gordura em detrimento da gliconeogênese. Isso é resultado de um aumento na síntese hepática de glicerol e ácidos graxos quando comparado com a glicose (1,4 até 18,9 vezes mais).

A adaptação à dieta contendo frutose resulta em aumento da atividade das enzimas lipogênicas no fígado. O aumento da síntese de lipídeos resulta em níveis mais elevados de lipídeos totais na circulação e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Hallfrisch, 1990).

Em seres humanos, alguns grupos são mais susceptíveis a apresentar hipertrigliciridemia após a ingestão de frutose. Mulheres pós-menopausa, homens hiperinsulinêmicos e diabéticos tipo 2 estão mais propensos. Outro fator importante é a ingestão conjunta de gordura e frutose, que leva a um efeito sinérgico, resultando num clareamento mais lento e em maior trigliciridemia (Hallfrisch, 1990).

O principal efeito da frutose no metabolismo lipídico é o de elevar os triglicerídeos, porém quando a frutose é utilizada substituindo açúcares complexos pode causar aumento também de colesterol (Hallfrisch, 1990).

Em vários estudos revisados por Reiser foram observados aumentos nos níveis de ácido úrico plasmático após o consumo de frutose na dieta, sendo mais propensos os pacientes com hipertensão arterial. A hiperuricemia observada poderia ser decorrente de um aumento do catabolismo dos nucleotídeos ou por aumento na síntese de purinas. Evidências confirmam as duas teorias; biópsias hepáticas mostram uma diminuição no conteúdo de nucleotídeos após infusão de frutose. Há um aumento na incorporação de glicina radiotiva no urato urinário após a infusão de frutose, indicando um aumento na síntese de purina (Hallfrisch, 1990).

A frutose na dieta pode levar a aumento significativo nos níveis de lactato. Isso ocorre devido a um aumento na atividade da frutoquinase que supera a capacidade de ação da fosfo-frutoquinase e em decorrência disso há um acúmulo de frutose-1-fosfato. Isso leva um aumento da atividade da piruvato-quinase. Os níveis de lactato decorrentes da frutose da dieta são menores que os encontrados após a infusão venosa (Hallfrisch, 1990).

A maioria dos estudos mostram que o sorbitol, no ser humano normal, é convertido primariamente em frutose e apenas uma pequena parte é metabolizada diretamente até glicose. Portanto, o metabolismo do sorbitol pode eventualmente levar à formação de glicose e glicogênio, através da gliconeogênese e lactato através da via glicolítica (Wang & Van Eys, 1981).

1.6. Metabolismo da frutose e do sorbitol no feto e no recém-nascido

1.6.1. Metabolismo placentário da frutose e do sorbitol

A glicose é o substrato primário para o metabolismo placentário e fetal. A proteína facilitadora de transporte de glicose GLUT1 é a isoforma encontrada em todas as células placentárias (Hahn et al., 1998).

A frutose de origem placentária não é um importante substrato para o metabolismo fetal, sob condições normais. Porém, em algumas espécies (ovinos, bovinos e suínos), a frutose é a forma de armazenamento de carboidratos que pode ser utilizada durante o jejum (Battaglia & Meschia, 1978).

Segundo Hay Jr, a produção de frutose pela placenta é exclusiva dos ruminantes e não ocorre de uma maneira considerável em humanos (Hay Jr, 1995).

A frutose foi encontrada em uma quantidade que variava de 0,10 a 0,83mg% no líquido amniótico de humanos (Lanza, 1967).

Em ovelhas os níveis de produção placentária, captação fetal e metabolismo fetal de frutose e lactato dependem do estado metabólico da mãe e do feto. A produção de frutose fetal na placenta é diretamente dependente das concentrações maternas de glicose. O jejum materno, o qual diminui a concentração materna e fetal de glicose e diminui a captação de glicose útero-placentária, diminui claramente a frutose fetal assim como a oxidação fetal de frutose (McGowan et al., 1995).

Em fetos humanos o sangue venoso umbilical e o sangue arterial fetal contêm níveis mais elevados de frutose que o sangue materno.

Segundo Pribylová (1973), a placenta participaria da síntese de frutose pela reação: Glicose $\xrightarrow{\text{NADPH} +}$ H+NADP Sorbitol $\xrightarrow{\text{NAD}}$ NADH+H Frutose, e o produto resultante seria rapidamente metabolizado tanto pelo adulto quanto pelo recém-nascido. Parte da frutose seria então convertida em glicose no fígado e poderia então servir como uma reserva de liberação lenta (Pribylová et al., 1973).

Em um estudo feito por Sabata (1977) foi observado que a infusão de frutose em mulheres gestantes em trabalho de parto, elevou os níveis de glicose tanto na mãe quanto no feto. Comparado com valores de controle, entretanto, essa elevação não foi significativa tanto na mãe quanto na veia e artéria umbilicais. A diferença arteriovenosa que poderia indicar um aumento na retenção de glicose, também não foi significativa. A passagem de frutose através da placenta foi substancialmente menor que a de glicose. Enquanto o valor da glicemia na veia umbilical representou aproximadamente 76% dos níveis maternos, apenas 26% da frutosemia materna pode ser encontrada na veia umbilical. Métodos estatísticos elaborados mostraram que, em comparação com a glicose, menos de metade da frutose atravessa a placenta (Pribylová et al., 1977).

Alguns estudos sugeriram que as proteínas facilitadoras do transporte de glicose GLUT2 e GLUT5 podem ser expressadas nas membranas apical e basal do sinciciotrofoblasto, respectivamente, da placenta humana (Reid et al., 1995).

O transportador de frutose é o GLUT5 (Burant et al., 1992; Rand et al., 1993; Blakemore et al., 1995; Kristiansen et al., 1997), e a sua expressão nas células BeWo (células de coriocarcinoma) e a habilidade dessas células em assimilar frutose, apesar de ser em pouca quantidade, é concordante com estudos prévios que mostravam que a frutose pode atravessar a placenta e entrar na circulação fetal, como mostrou Chinard, em 1956 (Shah et al., 1999).

Na placenta, a glicose é convertida à frutose pela aldolase redutase e sorbitol desidrogenase em várias espécies, incluindo o homem. As altas concentrações de frutose no sangue fetal de ungulados (ovelhas e suínos, por exemplo) resultam provavelmente da não utilização da frutose pelos fetos. Como a frutose não é uma fonte importante de energia fetal nesses casos, a conversão de glicose em frutose pode ter um papel osmo-regulatório ou servir em uma função de transidrogenase. Tal papel especial pode ser compatível com o fato de que os fetos humanos e de ratos não têm um nível sanguíneo alto de frutose e que a placenta dessas espécies contém uma transidrogenase sensível ao estradiol (Jeffery et al., 1983).

1.6.2. Metabolismo neonatal da frutose e do sorbitol

A frutose não é encontrada em altas concentrações após o nascimento. Concentrações típicas situam-se abaixo de 6mg/dl em humanos. Em espécies frutogênicas (ovinos, suínos e bovinos), durante a vida intra-uterina, podemos encontrar níveis de frutose superiores aos da glicose. O ser humano não é considerado uma espécie frutogênica (Sparks, 1992).

Em um estudo utilizando ratos, as enzimas relacionadas com o metabolismo da frutose foram avaliadas desde o nascimento até atingirem os valores de adultos. A frutoquinase atingiu os valores de adulto por volta dos 35 dias de vida. A atividade da aldolase B no fígado dos ratos recém-nascidos era similar à dos adultos (Sillero et al., 1970).

O sorbitol é encontrado no leite humano na quantidade de $17,3 \pm 11,8$ micromol/l nos primeiros 14 dias de lactação e de $24 \pm 6,4$ com 42 dias de lactação (Huisman, 1996).

1.7. Utilização clínica da frutose e do sorbitol

Minkowsky observou, em 1893, que a utilização de frutose não era prejudicada em diabéticos, provavelmente devido a independência da frutose em relação à insulina para a sua metabolização. Desde então, a frutose vem sendo recomendada para diabéticos (Sparks, 1992).

Minkowsky observou, em 1893, que cães pancreatectomizados conseguiam sintetizar glicogênio no fígado a partir de frutose, porém não conseguiam o mesmo com glicose. Esse estudo e observações clínicas efetuadas no decorrer dos anos reforçaram a idéia de que a frutose, assim como o sorbitol, seriam benéficos na dieta de pacientes diabéticos (Wang & van Eys, 1981).

Os argumentos que estimulam a utilização da frutose na dieta dos diabéticos são:

1. Transporte e distribuição da frutose e sorbitol até a sua etapa inicial de metabolismo, independente de insulina.
2. A absorção de frutose e sorbitol é mais lenta (20 a 30%) que a glicose.
3. A absorção de frutose e sorbitol resulta em mínimos ou transitórios aumentos na glicemia.
4. Parece ocorrer uma atividade adequada de síntese de glicogênio em humanos e em animais diabéticos, após a ingestão de frutose e sorbitol e a formação de glicogênio independe do nível de glicose sangüínea.
5. A frutose e o sorbitol têm um efeito anti-cetogênico.

Porém, alguns diabetologistas discordam do uso de frutose e sorbitol em dietas para diabéticos e argumentam que acima de 80% esses compostos serão metabolizados no fígado quase que exclusivamente até glicose e seu polímero, glicogênio. O efeito anti-cetogênico diminui proporcionalmente à gravidade da acidose diabética e a terapia com insulina e hidratação adequada são necessárias e muito mais eficazes que a infusão de substitutos de açúcar, como frutose e sorbitol.

A tendência atual é de que o uso de sorbitol e frutose é aceito pelos diabetologistas e tais compostos têm algumas pequenas vantagens no manuseio dietético do diabetes mellitus. A principal causa de rejeição de dietas com restrição de carboidratos para diabéticos é a ausência de substâncias doces (Wang & van Eys, 1981).

A frutose tem um baixo índice glicêmico, o que a torna uma alternativa como adoçante para os pacientes diabéticos que gostam de alimentos doces (Uusitupa, 1994).

A frutose foi utilizada para a prevenção e o tratamento da hipoglicemia neonatal. A justificativa para a sua utilização foi a de que a frutose não provocaria um efeito rebote de hipoglicemia, ao contrário da terapia com glicose (McCann et al., 1966).

A frutose tem sido utilizada como constituinte de regimes de nutrição parenteral. É considerada menos irritante para as veias do que a glicose, quando em concentrações semelhantes, e não tem efeito nos níveis de açúcar do sangue em pacientes no pós-operatório e em diabéticos (Bergström et al., 1972).

Os efeitos benéficos da infusão venosa de frutose são a independência da insulina no passo inicial do seu metabolismo, o risco menor de hipoglicemia após a interrupção abrupta da alimentação parenteral e um efeito potencial de poupar as proteínas (Wang & van Eys, 1981).

Uma infusão rápida, porém, pode resultar em acumulação de frutose-1-fosfato no fígado, rins e trato gastrointestinal com depleção intracelular de ATP, nucleotídeos de adenina e de fósforo inorgânico. Essas mudanças seqüenciais estão relacionadas com a dose e a velocidade de infusão (Wang & van Eys, 1981).

Föster e colaboradores preconizaram uma velocidade de infusão de 0,5g de frutose/Kg de peso corporal/h, a qual parece ser segura e bem tolerada durante 48-72h em pacientes normais e pacientes de unidades de terapia intensiva (Föster et al., 1977).

Apesar da frutose ser bem tolerada por via oral, foi observada toxicidade após a infusão intravenosa rápida (Sparks, 1992). Os efeitos adversos incluem a acidose láctica (Bergström et al., 1992) e a hiperuricemia. Estudos subseqüentes estabeleceram que essa elevação nos níveis plasmáticos e urinários de ácido úrico em humanos acontecia devido a uma rápida degradação do ATP hepático usado na reação da frutoquinase (Perheetupa et al., 1967).

Experimentos em ratos, usando frutose parenteral, demonstraram que a concentração de ATP caía em aproximadamente 40% após 2 minutos, seguindo-se de um aumento equivalente de AMP e ADP (Davies et al., 1998).

Uma sobrecarga intravenosa de frutose induz a uma acentuada depleção de ATP e P_i , acompanhada de uma depleção de UTP e UDPG. Essa reação é seguida por um catabolismo até os respectivos produtos finais, tendo como consequência uma elevação no ácido úrico e na uridina plasmática e urinária (Davies et al. 1998).

O sorbitol também foi utilizado como componente de nutrição parenteral (Bye, 1969); (Lee et al., 1972). Os argumentos a favor de seu uso são os mesmos da frutose: menos dependente de insulina, melhor tolerado que a glicose em caso de lesão renal ou hepática, menos cetogênico, menos associado a fenômenos trombóticos durante a infusão e tem um efeito protetor sobre as proteínas. A velocidade de infusão de 0,25g/kg/h. Essa infusão foi associada a aumento de ácido úrico e dos níveis de bilirrubina sangüíneos.

O uso de frutose foi sugerido no manuseio dietético da diarréia intratável da infância. A frutose é uma fonte alternativa efetiva de carboidrato para crianças incapazes de tolerar polímeros de glicose (Clark et al., 1986).

A frutose foi utilizada no tratamento da intoxicação alcoólica aguda. Estudos indicaram que 500ml de frutose a 40%, dados em um período de 30 minutos, aumentavam em cerca de 25% a taxa de declínio dos níveis de etanol sangüíneo. As doses recomendadas variaram de 1 a 3 litros de solução de frutose a 10%. A acidose láctica é um efeito potencialmente grave. A falta de pesquisas clínicas controladas e outras evidências convincentes contra-indicam a sua utilização de rotina (Coarse & Cardoni, 1975).

Um derivado fosforilado da frutose vem sendo investigado para ser utilizado como agente neuroprotetor na encefalopatia hipóxico-isquêmica. Trata-se da frutose-1,6-difosfato. A administração desse composto em ratos reduz de forma significativa a lesão histológica cerebral (Sola et al., 1996). A atividade estabilizadora da frutose-1,6-difosfato inclui uma menor depleção de ATP através de um aumento da glicólise, ativando a via da pentose fosfato, prevenindo a formação de radicais oxigênio-reativos, e mantendo a concentração de Ca^{++} e Na^+ em níveis normais (Markov et al., 1997); (Roig et al., 1997).

Outras utilizações possíveis da frutose-1,6-difosfato incluem: melhora do desempenho cardíaco após cirurgia de colocação de marcapasso cardíaco, melhora do desempenho cardíaco na insuficiência cardíaca, choque sépticos, lesão aguda pulmonar (Sherman, 1998).

1.8. Frutose, sorbitol e erros inatos

Erros inatos do metabolismo da frutose têm sido descritos desde longa data. Eles têm incidência baixa e os sintomas quando presentes são inespecíficos. As principais alterações associadas a esses erros inatos são a hipoglicemia e a acidose metabólica. Os erros inatos associados do metabolismo da frutose são: frutosúria essencial, intolerância hereditária à frutose e a deficiência de frutose-1,6-difosfatase, dos quais faremos um breve relato.

1.8.1. Frutosúria essencial

Trata-se de uma anomalia sem sintomas ou sinais visíveis. Acomete mais indivíduos de origem judaica e a sua incidência é de 1:120.000. Essa anomalia é transmitida através de uma herança autossômica recessiva (Kliegman, 1996).

O defeito enzimático é a deficiência de frutoquinase. Em decorrência disso, há um aumento dos níveis de frutose sanguínea após a ingestão de alimentos contendo sacarose ou frutose. Cerca de 10 a 20% da frutose ingerida será eliminada através da urina, sem provocar diurese osmótica. Os níveis elevados de frutose não levam a nenhuma consequência metabólica e os pacientes são assintomáticos. Era detectada nos testes de triagem de diabetes, baseados nas propriedades redutoras da glicose (solução de Benedict e Clini-test). Como ocorreu substituição por métodos mais específicos, que usam a glicose-oxidase, não há mais reação cruzada. A expectativa de vida dos pacientes com frutosúria essencial é normal (Froesch, 1976).

1.8.2. Intolerância hereditária à frutose

O defeito enzimático primário é a ausência total da clivagem da frutose -1-fosfato pela aldolase hepática. Todos os sinais e sintomas são decorrentes do acúmulo de frutose-1-fosfato, diminuição do nível de fósforo inorgânico intracelular, desarranjo no potencial de fosfato e inibições enzimáticas secundárias pelo acúmulo de frutose-1-fosfato pela inibição da fosforilação da frutose pela frutoquinase. Conseqüentemente há aumento de frutose no sangue e eliminação pela urina, bloqueio da atividade da fosforilase e da frutose-1,6-difosfato-aldolase e com isso há diminuição da formação de glicose do glicogênio e interrupção da gliconeogênese. Os bloqueios enzimáticos, envolvendo a fosforilase e a frutose-1,6-difosfato, explicam o aparecimento de hipoglicemia persistente. Os outros sintomas, como náuseas e vômitos, são explicados pelo acúmulo de frutose-1-fosfato e pelo desarranjo do metabolismo do fosfato e da energia na mucosa intestinal. As alterações promovendo o acúmulo de frutose-1-fosfato e alteração do metabolismo de fosfato provocam, nos rins, perda da capacidade de acidificação urinária e de reabsorção tubular de fosfato pelos túbulos (Froesch, 1976).

A forma de transmissão dessa doença genética é a herança autossômica recessiva, sendo os pais, via de regra, normais. A incidência, de 1:40.000 (Kliegman, 1996), é igual em ambos os sexos. A consangüinidade foi observada em várias famílias afetadas (Froesch, 1976).

As manifestações dessa doença dependem da introdução de dieta com alimentos que contenham frutose. Nas crianças que são amamentadas exclusivamente ao seio materno essa sintomatologia só se iniciará quando a criança começar a receber alimentos com frutose, isto é, normalmente por volta do sexto mês de vida. Quando isso acontece, a criança apresentará náuseas, vômitos e hipoglicemia após a ingestão de alguma substância com sacarose ou frutose (geralmente suco de laranja). Nas crianças que não recebem aleitamento materno, e sim fórmulas lácteas contendo frutose, na forma de sacarose, o quadro clínico será diferente. Essas crianças não se desenvolverão normalmente e terão problemas logo nos primeiros dias de vida.

Há perda de peso, desidratação, hepatomegalia e aminoacidúria. Se a patologia não for diagnosticada e não for introduzida uma dieta livre de frutose, essas crianças irão morrer durante o primeiro mês de vida. As crianças com intolerância hereditária à frutose e que sobreviveram até os 6 meses de vida, têm um prognóstico melhor, uma vez que com essa idade a criança já recusa o alimento que contém frutose e acaba se protegendo. Por isso, as crianças amamentadas ao seio materno têm um melhor prognóstico (Froesch, 1976).

O diagnóstico deve ser suspeitado nas crianças que apresentem vômitos sem explicação. A investigação diagnóstica inclui o rastreamento de frutose na urina, dosagem de fosfato inorgânico sérico e glicemia após a ingestão de substâncias contendo frutose. O teste de tolerância à frutose pode ser realizado. A infusão intravenosa de frutose provocará hipoglicemia e queda acentuada e prolongada no fosfato inorgânico plasmático e alterações urinárias como aumento do pH urinário e excreção de fosfato, nos pacientes com intolerância hereditária à frutose. Essas alterações são reversíveis após o teste. A biópsia hepática para a determinação da atividade da aldolase é a etapa seguinte na investigação diagnóstica (Froesch, 1976).

O tratamento é a introdução de uma dieta isenta de frutose. Um aspecto interessante é que pacientes adultos com intolerância hereditária à frutose não apresentam cárie dentária. Geralmente as crianças evoluem bem, após a introdução da dieta (Froesch, 1976).

1.8.3. Deficiência de frutose -1,6- difosfatase

Doença descrita inicialmente por Baker & Winegrad (1967). O defeito básico é a deficiência de frutose-1,6-difosfatase, determinando que o fígado só poderá produzir glicose a partir do glicogênio, enquanto possuir glicogênio armazenado. A frutose-1,6-difosfatase é necessária para a condensação de trioses em frutose-1,6-difosfato e, portanto para a formação de glicose a partir de todas as fontes glicogênicas. O metabolismo da frutose não é controlado nas etapas iniciais e a regulação ocorre através da via glicolítica.

Conseqüentemente os ésteres de triose não podem ser convertidos em glicose e glicogênio e, portanto, a maior parte da frutose é rapidamente liberada do fígado sob a forma de lactato. Há uma inibição do metabolismo da frutose pela acumulação de frutose-1,6-difosfato, α - glicerofosfato e provavelmente frutose 7-1-fosfato (Froesch, 1976).

É uma doença transmitida geneticamente através de herança autossômica recessiva. Os pais geralmente são normais, porém a determinação enzimática deles mostrará uma concentração de 50% do normal, sendo, portanto possível determinar os portadores heterozigotos. A doença tem igual incidência nos sexos masculino e feminino (Froesch, 1976).

A criança com deficiência de frutose-1,6-difosfatase apresenta hipoglicemia e acidose láctica. Todos os pacientes têm hepatomegalia decorrente de infiltração gordurosa, porém não há evolução para cirrose. O nutriente clássico que precipita a acidose láctica é a frutose. Os substratos endógenos mais importantes que precipitam a acidose são o glicerol e aminoácidos (que aparecem em situações catabólicas como stress, febre e infecção). Diferente da intolerância hereditária à frutose, a história dietética não irá auxiliar no diagnóstico. Geralmente as crianças afetadas apresentam um desenvolvimento normal até que alguma infecção desencadeia a crise de hipoglicemia e acidose. Durante a crise, a hipoglicemia pode ser grave e não é responsiva ao glucagon, pois não há glicogênio hepático (Froesch, 1976).

Devemos suspeitar dessa patologia quando a criança apresentar hipoglicemia, acidose láctica e hepatomegalia. O diagnóstico pode ser feito, após o controle da crise hipoglicêmica e da acidose, através de um teste. Esse teste consiste em manter a criança em jejum por 10 a 20 horas, quando as crianças afetadas apresentarão hipoglicemia que aparecerá, normalmente após 12 horas do início do jejum. A partir de então deve ser testada a sua reação ao glucagon. A resposta será negativa, evidenciando ausência de glicogênio hepático. A confirmação diagnóstica é feita pela biópsia hepática, quando não se encontra a enzima frutose-1,6-difosfatase (Froesch, 1976).

O tratamento deve ser sintomático na crise (glicose e correção da acidose com bicarbonato) e iniciar uma dieta isenta de frutose (Quadro 2). A sacarose deve ser substituída por glicose e o jejum deve ser evitado. A expectativa de vida é praticamente normal nos pacientes bem controlados (Froesch, 1976).

2. Objetivos

Em decorrência da pouca informação a respeito do metabolismo da frutose no feto e no recém-nascido e tendo em vista o potencial terapêutico dessa hexose, temos como objetivo:

2.1. Geral

Utilizar o método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação de frutose no sangue de recém-nascido.

2.2. Específicos

1. Desenvolver um método adequado para a determinação da frutose no sangue de recém-nascido através da cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)
2. Determinar se o método HPLC é eficaz em amostras pequenas e com baixas concentrações de frutose.
3. Determinar os níveis de frutose em recém-nascidos a termo com pesos adequados para a idade gestacional com 48 horas de vida e sob aleitamento materno exclusivo.
4. Relacionar os níveis sanguíneos de frutose com glicose e sorbitol nos recém-nascidos a termo com 48 horas de vida, em aleitamento materno exclusivo.

3. Casuística e Métodos

3.1. Tipo de estudo

É um estudo prospectivo, elaborado após a sua aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. (Anexo 37).

Trata-se de uma parte de uma pesquisa mais abrangente, na qual foram coletadas amostras de sangue da mãe e do cordão logo após o parto e do recém-nascido com 48 horas de vida. A pesquisa completa deverá ser apresentada como tese de doutorado. Juntamente com a frutose foram determinados os níveis de galactose, que resultaram em tese de mestrado já apresentada (Bossolan, 2000). (Anexo 38)

3.2. Seleção da casuística

Para a pesquisa, 30 parturientes com gestação a termo e evoluindo para parto normal, internadas na Maternidade do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP e na Maternidade do Hospital Sorocabanos, de Botucatu.

Após consulta e autorização das parturientes, foi obtido o consentimento livre e esclarecido e dados da gestação e condições sociais e alimentares das parturientes foram anotados em um protocolo, conforme modelo (Anexo 1).

A coleta das amostras de sangue do recém-nascido com 48 horas de vida foi feita após a assinatura do consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). O período de coleta foi de julho de 1999 a março de 2000.

3.3. Seleção dos recém-nascidos

Os recém-nascidos foram selecionados no momento do parto, após a análise de informações fornecidas pela mãe e pelo obstetra, na sala de parto. Caso os dados do recém-nascido fossem conflitantes com as informações, este era excluído.

Os recém-nascidos selecionados nasceram a termo, isto é, com idade gestacional entre 37 e 41 semanas e 6 dias, baseadas na regra de Naegle (data da última menstruação) (Delascio & Guariento, 1994) e confirmada pelo método de (Capurro et al., 1978), e com peso adequado para a idade gestacional (Lubchenco et al., 1970).

3.4. Critérios de inclusão

- a) As mães deveriam ter realizado um controle pré-natal adequado, tendo um número de consultas superior a quatro.
- b) Boletim de Apgar (Apgar, 1967) dos recém-nascidos deveria ser maior ou igual a 7 ao nascimento.
- c) Os recém-nascidos de termo deveriam ter os pesos adequados para a idade gestacional, isto é, situados entre os percentis 10 e 90 da curva de Lubchenco et al., (1970).
- d) Crianças nascidas através de parto vaginal, sem uso de fórceps e com apresentação cefálica.
- e) As mães não deveriam receber medicamentos que pudessem interferir nos níveis de glicose sanguínea e de preferência sem infusão venosa de soro glicosado durante as 24 horas que antecedessem o parto.
- f) Os recém-nascidos não deveriam apresentar nenhum tipo de doenças ou complicações nos períodos perinatal ou pós-natal. Não deveriam apresentar distúrbios metabólicos ou icterícia que necessitasse de fototerapia e/ou exsanguíneo transfusão.
- g) Deveriam estar sob aleitamento materno exclusivo e em alojamento conjunto.

3.5. Critérios de exclusão

Foram excluídos:

- a) Todos recém-nascidos que apresentassem boletim de Apgar abaixo de 8, que tivessem malformações e que desenvolvessem qualquer tipo de doença ou complicação.
- b) Recém-nascidos que receberam outro tipo de alimentação que não o aleitamento materno
- c) Recém-nascidos de mães que não assinaram o consentimento
- d) Recém-nascidos de mães que não sabiam ao certo a idade gestacional.

3.6. Procedimentos com os recém-nascidos

1. Os recém-nascidos foram pesados logo após os primeiros cuidados pós-nascimento. Essa medida de peso foi realizada em balança eletrônica Filizolla, modelo Bip Baby, graduada com divisões de 5 gramas.
2. A medida de comprimento dos recém-nascidos foi feita com antropômetro de madeira, calibrado em mm, tendo uma parte fixa, colocada na posição cefálica e outra móvel, nos pés.
3. Perímetro cefálico foi determinado através de uma fita métrica que foi passada, na parte posterior, na altura do processo mais proeminente da região occipital, lateral e bilateralmente na região acima dos pavilhões auriculares e frontalmente na altura da glabella. A fita deveria ser confeccionada com um material inelástico, tendo 1 centímetro de largura e calibrada em mm. Feita aproximação para o milímetro superior encontrado (Sharma et al., 1990).

3.7. Coleta das amostras

1. As amostras foram coletadas com os recém-nascidos tendo 48 horas de vida, mais ou menos 5 horas.
2. Os recém-nascidos foram pesados com roupa, amamentados e pesados, após.
3. A coleta ocorreu 30 minutos após o início da mamada.
4. Técnica de coleta:
 - a) Anti-sepsia com álcool.
 - b) Punção venosa periférica efetuada no dorso das mãos.
 - c) Sangue foi gotejado em um tubo seco com uma gota de heparina. O volume aproximado foi de 3 ml e após centrifugação foi armazenado para futura complementação deste trabalho.
 - d) 400 microlitros foram retirados dessa amostra inicial e transferidos para um tubo previamente resfriado, com uma solução empregada para desproteínizar a amostra e interromper a glicólise, sendo processada e armazenada em um freezer a -80°C , para posteriormente ser analisada pela HPLC.
 - e) Parte excedente do sangue foi desproteínizada pelo ácido perclórico a 10% e armazenada em freezer a -80°C , para posterior dosagem de piruvato e lactato, que serão utilizados em trabalho posterior.

3.8. Método para a determinação da frutose no sangue

Em decorrência da pequena quantidade de frutose a ser dosada nas amostras, o método escolhido para a determinação de frutose no sangue foi a cromatografia líquida de alta resolução. Através deste método foi possível também determinar outros carboidratos, como a glicose, o sorbitol e a galactose.

3.8.1. A cromatografia líquida de alta resolução

Trata-se de um método físico-químico de separação, onde os constituintes de uma amostra são separados entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. Através deste método a fase móvel é líquida e é uma técnica de ultra-micro-análise podendo quantificar massas de componentes inferiores a 10^{-18} g (Ciola, 1998).

O aparelho de cromatografia líquida de alta resolução é composto por:

- a) Reservatório e sistema de bombeamento de fase móvel – é através desse sistema que o solvente é bombeado, junto com a amostra infundida até a coluna cromatográfica. As pressões chegam até 500atm, com vazões de 0,005 até 5ml/min. Com esse sistema de bombeamento, a fase móvel mantém-se constante durante a análise.
- b) Fase móvel – a água é o solvente indicado para a leitura através de índice de refração. O índice de refração da água (RI) é de 1,3325. Ela deve ser previamente destilada e deionizada e posteriormente purificada através do sistema “Milli-Q”, ficando isenta de bactérias e íons metálicos.
- c) A coluna – é onde ocorre a separação dos componentes da amostra. Normalmente a coluna é aquecida através de um forno e essa temperatura deve ser mantida constante.

- d) Detector de índice de refração – o princípio da detecção envolve as medidas das mudanças no índice de refração do efluente da coluna que passa através de uma sela de fluxo. Quanto maior a diferença do índice de refração entre a amostra e a fase móvel, maior será o desnível. Portanto a sensibilidade será maior quanto maior a diferença de índice de refração entre a amostra e a fase móvel.
- e) Organização dos dados – os dados que o detector detecta são transformados em sinais que formarão gráficos. Os gráficos são os cromatogramas. Os picos formados serão utilizados para cálculos de área e então poderão fornecer dados quantitativos tendo como referência uma curva padrão.

3.8.2. Cromatógrafo utilizado na análise das amostras

O aparelho utilizado foi o modelo Varian 9012.

O solvente usado, como fase móvel, foi a água, um solvente polar.

A coluna utilizada foi uma coluna específica para carboidratos, também fabricada pela empresa Varian. Ela era composta por uma resina de troca catiônica na forma de cálcio iônico, tendo diâmetro de 0,65 cm e comprimento de 30 cm.

A pressão máxima foi de 55atm e um fluxo de 0,5 ml/minuto foi utilizado para mover a fase móvel. A temperatura foi mantida em 90°C.

O detector utilizado foi o detector de índice de refração 9040, também da empresa Varian, a uma temperatura de 35°C.

O programa L.C. Star Workstation, fornecido pela Varian, foi o responsável pela transformação de dados do detector de índice de refração em cromatogramas.

A montagem do método e a posterior análise das amostras foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP.

3.8.3. Determinação da frutose nas amostras

3.8.3.1. Preparo da amostra

O tubo de coleta foi previamente preenchido com 100 μ l de água gelada e processado no aparelho de Milli-Q, mais 50 μ l de padrão interno da amostra (Manitol a4mg/dl), 50 μ l de solução de hidróxido de sódio (0,5N), 1ml de acetona pura e 200 μ l de solução de sulfato de zinco (10%w/v).

Essa técnica foi modificada a partir do método original de Hu e colaboradores (1995) qual emprega tubos de ensaio separados para as várias passagens. Após realizarmos testes com o preparo de tubos separados e comparando com o preparo em um único tubo, observamos que se reduzindo o número de passagens e o número de tubos havia redução na perda de amostra e melhora na recuperação (Hu et al., 1995).

Coletamos amostras de sangue por punção venosa periférica, sendo que 0,4ml foi transferido para o tubo previamente preparado. Essa solução foi então homogeneizada através de um agitador de tubos, modelo AT56 da marca Phoenix, por 30 segundos e posteriormente centrifugada a 1880g por 15 minutos. Acrescentou-se 50 μ l de solução de cloreto de bário (10%w/v) para facilitar a desproteinização e precipitar o sulfato de zinco residual, sendo novamente centrifugado por 15 minutos. O sobrenadante foi colocado em um tubo de 10ml e evaporado em fluxo contínuo de nitrogênio a 50°C por 30 minutos. As amostras preparadas foram estocadas em freezer a -80°C durante 7 dias. Para a determinação pelo HPLC, as amostras foram reconstituídas com uma solução de EDTA Ca (50 μ l/ml) ao volume final de 400 μ l, foram filtradas em membranas Durapore de 0,45 μ m e injetadas no aparelho de cromatografia.

3.8.3.2. Recuperação da amostra:

O manitol foi utilizado como padrão interno da amostra, isto é, serviu para quantificar a recuperação do método durante a análise da amostra. O manitol é considerado um bom padrão interno porque não é encontrado normalmente no sangue. Sabendo-se a quantidade de manitol recuperada foi feita a correção para os demais carboidratos.

3.9. Análise estatística

Para a análise da descrição da casuística, medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio-padrão) e também a mediana e porcentagem foram calculadas (Streiner & Norman, 1994).

Na comparação de duas médias o teste *t* de Student foi utilizado; nos casos em que as suposições deste teste não mostraram uma distribuição normal das variáveis e igualdade entre as variâncias foi então utilizado o teste de Mann-Whitney (Streiner & Norman, 1994).

Na análise das variáveis bioquímicas dos recém-nascidos utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson e de Spearman e feita a análise de regressão linear (Streiner & Norman, 1994).

O nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

O Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu aprovou esse projeto de pesquisa.

4. Resultados

4.1. Resultados referentes ao método

4.1.1. Recuperação da amostra

A porcentagem de recuperação do padrão interno, o manitol, baseada na qual foi feito o cálculo de correção para os demais carboidratos foi em média de 87,82% ($\pm 13,15$). (Tabela 1).

Tabela 1 Valor do manitol injetado, manitol recuperado e porcentagem da recuperação de cada amostra.

Nº	Manitol padrão (mg/dl)	Manitol da amostra (mg/dl)	% de recuperação do manitol da amostra	Nº	Manitol padrão (mg/dl)	Manitol da amostra (mg/dl)	% de recuperação do manitol da amostra
1	50	40,75	81,5	16	50	48,59	97,18
2	50	38,39	76,79	17	50	49,59	98,99
3	50	46,68	93,37	18	50	49,55	99,1
4	50	34,1	68,2	19	50	51,93	103,86
5	50	35,16	70,32	20	50	59,44	118,88
6	50	40,29	80,58	21	50	52,54	105,085
7	50	43,16	86,3	22	50	61,05	122,1
8	50	47,64	95,28	23	50	41,33	82,67
9	50	46,71	93,42	24	50	37,7	75,41
10	50	39,77	79,54	25	50	43,41	86,82
11	50	37,06	74,13	26	50	42,27	84,55
12	50	42,59	85,18	27	50	43,75	87,5
13	50	38,32	76,66	28	50	35,78	71,56
14	50	41,5	83,01	29	50	43,83	87,66
15	50	39,38	78,76	30	50	45,01	90,21

	Manitol da amostra (mg/dl)	% de recuperação do manitol da amostra
Média	43,90	87,82
DP	6,57	13,15
CV (%)	0,15	0,15

4.1.2. Correlação entre o padrão interno da amostra e os níveis de frutose e glicose dos recém-nascidos

Os níveis de manitol acrescentados à amostra (padrão interno) apresentaram correlação altamente significativa pela correlação de Spearman, r igual a 0,99 ($p < 0,01$), com os valores obtidos pelo cálculo da percentagem de recuperação do manitol, conforme mostrado na Tabela 2.

Em relação à glicose e a percentagem de recuperação da amostra, obtivemos resultado significativo pela correlação de Spearman, r igual a -0,52 ($p < 0,01$), para frutose r igual a -0,39 ($p < 0,05$) e para o sorbitol r igual a -0,52 ($p < 0,01$), indicando também que quanto maior a percentagem de recuperação do manitol na amostra, menor a perda de glicose, frutose e sorbitol nesta, durante o seu processamento, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Relação entre a percentagem de recuperação do manitol da amostra, com os níveis de glicose, frutose e sorbitol no sangue de recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional.

Variáveis	Percentagem de recuperação
Glicose	-0,52*
Frutose	-0,39
Sorbitol	-0,52*
Manitol	0,99*

* $P < 0,01$ r = coeficiente de correlação

4.1.3. Resultados referentes à curva padrão das variáveis bioquímicas no HPLC

Para a dosagem de glicose, frutose, sorbitol e manitol, pelo HPLC, foram efetuadas curvas padrão distintas, sendo utilizados 3 pontos para cada curva padrão, com 2 repetições para cada ponto da curva. A apresentação gráfica das curvas padrão encontram-se no Anexo 6.

Para cada ponto da curva padrão, foram calculadas as percentagens das áreas correspondentes aos valores bioquímicos previamente conhecidos, num determinado tempo de saída nos cromatogramas.

A média das áreas para os três pontos consecutivos da curva padrão de glicose foram respectivamente de 314341,5 cm² (\pm 3249,16), de 626444 cm² (\pm 19417,15) e de 1567319 cm² (\pm 11786,76).

A média das áreas para os três pontos consecutivos da curva padrão de frutose foram respectivamente de 13660,5 cm² (\pm 27,57), de 26808 cm² (\pm 905,09) e de 55733 cm² (\pm 369,10).

A média das áreas para os três pontos consecutivos da curva padrão de sorbitol foram respectivamente de 19401 cm² (\pm 131,52), de 37857cm² (\pm 984,29) e de 55733 cm² (\pm 369,10).

A média das áreas para os três pontos consecutivos da curva padrão de manitol foram respectivamente de 156310,5 cm² (\pm 1957,97), de 294552 cm² (\pm 8625,28) e de 455760,5 cm² (\pm 2351,13).

A média dos tempos de saída dos três pontos consecutivos da curva padrão de glicose foram respectivamente de 9,61 min (\pm 0,018), de 9,625 min. (\pm 0,011) e de 9,621 min. (\pm 0,016), sendo que a média geral de todos os pontos foi de 9,62 min. (\pm 0,012) .

A média dos tempos de saída dos três pontos consecutivos da curva padrão de frutose foram respectivamente de 11,22 min (\pm 0,012), de 11,22 min (\pm 0,010) e de 11,22 min (\pm 0,014), sendo que a média geral de todos os pontos foi de 11,22 min. (\pm 0).

A média dos tempos de saída dos três pontos consecutivos da curva padrão de sorbitol foram respectivamente de 14,52 min ($\pm 6,36$), de 14,52 min. ($\pm 12,02$) e de 14,52 min ($\pm 2,12$), sendo que a média geral de todos os pontos foi de 14,52 min. (± 0).

A média dos tempos de saída dos três pontos consecutivas da curva padrão do manitol foram respectivamente de 13,71min ($\pm 0,005$), de 13,71 min. ($\pm 0,014$) e de 13,71min (± 0006), sendo que a média geral de todos os pontos foi de 13,71 (± 0).

4.2. Resultados referentes aos recém-nascidos

4.2.1. Características da população de recém-nascidos

Foram estudados 30 recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional, nascidos de parto normal. Na tabela 3 encontram-se as principais características dos 30 recém-nascidos

Tabela 3. Características descritivas gerais dos recém-nascidos.

Variável	n	Média	DP	Md	CV(%)	V.Min.	V.Max.
IG (dias)	30	278	8.09	279	2.87	266	293
Apgar 1	30	8.82	0.71	9	8.06	7	10
Apgar 5	30	9.83	0.37	10	3.85	9	10
Peso (g)	30	3246	314	3192	9.68	2630	3805
Δ Peso (g)	30	14.16	2.93	15	20.69	10	20
PC (cm)	30	34	0.98	34	2.89	32	35.50
PT (cm)	30	33.26	1.45	33	4.38	31	38
Comp(cm)	30	48.33	2.05	48	4.24	44.5	53.00

Δ Peso (g) = diferença de peso antes e depois da mamada

Na Tabela 4 encontram-se os resultados bioquímicos dos recém-nascidos. A média dos níveis sanguíneos de glicose foi de 55,44 mg/dl ($\pm 10,10$), com limites extremos de 36,88 mg/dl e 80,07 mg/dl (Figura 7). A média dos níveis sanguíneos de frutose foi de 3,67mg/dl ($\pm 0,93$), com limites extremos de 1,85 mg/dl e 5,29 mg/dl (figura 8). A média dos níveis sanguíneos de sorbitol foi de 1,69 mg/dl ($\pm 0,84$), com limites extremos de 0,22 mg/dl e 3,25 mg/dl (Figura 8).

Tabela 4. Características descritivas gerais das variáveis bioquímicas dos recém-nascidos.

Variável	n	Média	DP	Md	CV	V.Min.	V.Max.
Glicose	30	55,44	10,10	55,40	18,21	36,88	80,07
Frutose	30	3,67	0,93	3,55	25,34	1,85	5,29
Sorbitol	30	1,69	0,84	1,95	49,70	0,22	3,25

Os cromatogramas dos recém-nascidos encontram-se nos Anexos 7 a 36.

Figura 7. Valor médio dos níveis sangüíneos de glicose (mg/dl) em recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional com 48 horas de vida.

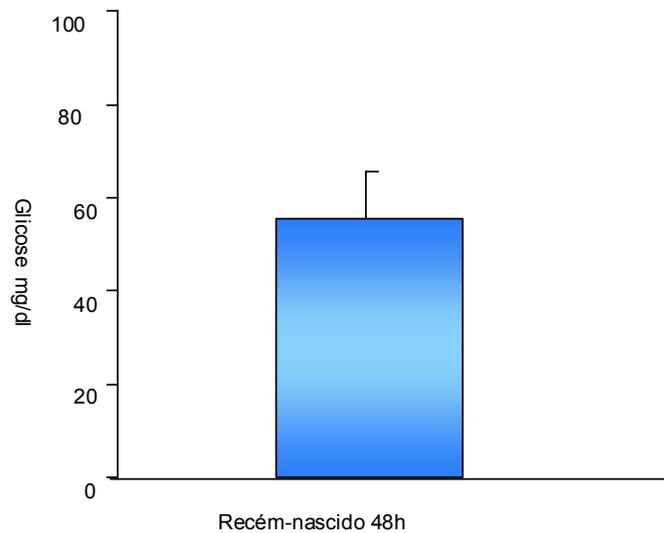
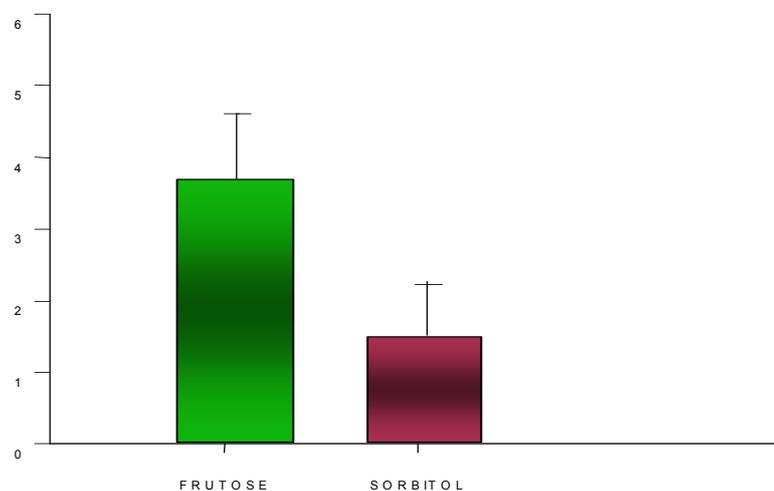


Figura 8. Valor médio dos níveis sangüíneos de frutose (mg/dl) e sorbitol (mg/dl) em recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional com 48 horas de vida.



4.3. Relação entre as variáveis bioquímicas dos recém-nascidos

As variáveis bioquímicas dos recém-nascidos, que apresentaram efeitos significativos na correlação de Pearson, encontra-se na Tabela 5. Observamos correlação significativa entre os níveis séricos de frutose e sorbitol, $r = 0,38$ ($p < 0,05$) no recém-nascido, conforme mostrado na Tabela 5 e Figura 9.

Tabela 5. Coeficiente de correlação de Pearson para variáveis bioquímicas dos recém-nascidos.

Variável/r	Glicose	Frutose	Sorbitol
Glicose		0,02	0,27
Frutose			0,38*

* $P < 0.05$

r = coeficiente de correlação

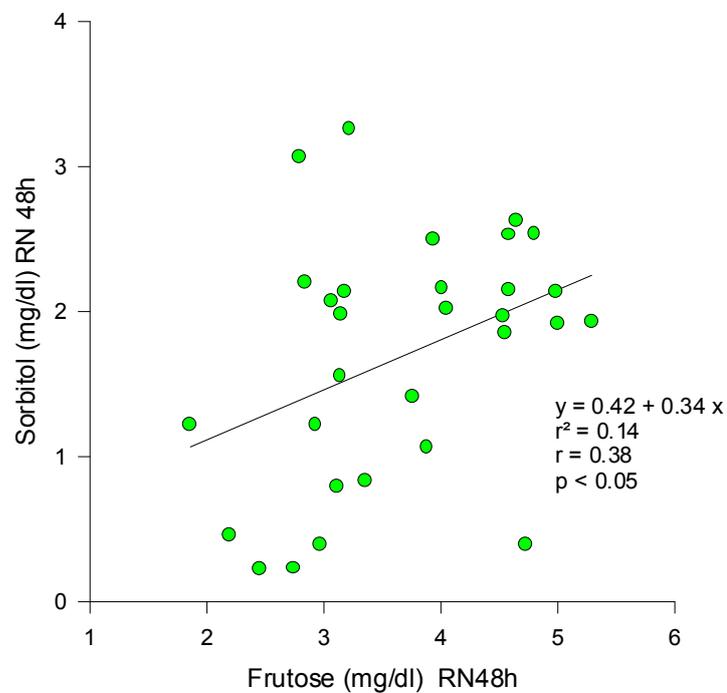


Figura 9. Relação entre os níveis sanguíneos de frutose e de sorbitol em recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional com 48 horas de vida.

5. Discussão

5.1. Método

5.1.1 Cromatografia líquida de alta resolução

Após extensa revisão bibliográfica, pudemos constatar a existência de diversos métodos bioquímicos para a determinação da quantidade de frutose em fluídos orgânicos. Os principais problemas encontrados na determinação dessa hexose são a quantidade extremamente baixa desse açúcar nos fluídos orgânicos e a interferência da glicose, outra hexose, no resultado final.

Entre os diversos métodos utilizados, podemos citar os métodos enzimáticos. O método de Roe, de 1934, é um exemplo (Macdonald & Turner, 1968). Outro método enzimático muito importante e citado é o método descrito por Bernt e Bergmeyer (Bernt & Bergmeyer, 1974). Nos métodos enzimáticos, diversas enzimas podem ser utilizadas. As mais comuns são: hexoquinase, fosfoglicico-isomerase e glicose-6-fosfato-desidrogenase. Mais recentemente a D-frutose desidrogenase e a frutoquinase também foram utilizadas (Liu et al., 1989)

O método fluorimétrico, utilizando a sorbitol-desidrogenase e quantificando NADH/NAD foi empregado como um micro-método para a determinação de frutose em plasma e eritrócitos (Liu et al., 1989)

O método de Chinard e colaboradores utiliza o resorcinol e um colorímetro (Chinard et al., 1956). Uma modificação desse método, usando a antrona, foi descrita para a dosagem de frutose por Nixon (Nixon, 1969).

A espectrofotometria com a quantificação de NADH oxidado é também um método empregado (Liu et al., 1989).

Dentre os métodos cromatográficos podemos citar a cromatografia gasosa (Kusmierz et al., 1989) e a cromatografia líquida de alta resolução (Joelley et al., 1970) e espectrometria de massa (Pitakänen & Kanniken, 1994).

A nossa opção pela cromatografia líquida de alta resolução para a dosagem da frutose no sangue de recém-nascidos deveu-se à grande sensibilidade dessa técnica na dosagem de carboidratos no sangue e a possibilidade de usar quantidades mínimas de sangue em cada amostra, o que é muito importante quando estamos lidando com recém-nascidos.

A técnica utilizada foi a técnica descrita por Hu e colaboradores, com modificações (Hu et al., 1995).

O método foi sensível e preciso, detectando valores mínimos 1,85mg/dl de frutose e 0,22mg/dl de sorbitol.

5.1.2. Coleta e preparo das amostras

Não encontramos dados na literatura sobre o tempo ideal para a coleta de amostras de sangue para a detecção da frutose e do sorbitol.

Padronizamos o tempo de 30 minutos após a mamada, pois este corresponde ao tempo médio de uma mamada de recém-nascidos.

No trabalho feito por Macdonald e Turner (1968), com sobrecarga de sacarose por via oral em adultos e com determinação de frutose e glicose através do método de Roe, as coletas das amostras foram aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a ingestão de açúcar. O pico máximo de frutose foi de 8,0 mg/100ml, 90 minutos após a ingestão (Macdonald & Turner, 1968).

Considerando-se que o leite materno não possui frutose e que a frutose encontrada nos recém-nascidos seja de origem endógena, proveniente da glicose, é provável que o tempo mais adequado para a coleta pudesse ser mais tardio.

5.1.3. Padrão interno das amostras

Utilizamos o manitol como padrão interno. Na literatura encontramos relatos sobre a presença de manitol no sangue humano (Yoshioka et al., 1984), (Soummer-Dauphant et al., 1976) porém em quantidades ínfimas. Em testes não conseguimos detectar a presença de manitol no sangue.

5.1.4. Fase móvel

Utilizamos a água, que é um solvente polar. A água foi inicialmente destilada e purificada pelo sistema Milli-Q, que é necessário para a retirada de impurezas e bactérias que podem interferir na análise. A água ainda foi filtrada em filtro de poro de $0,45\mu\text{cm}$ em uma bomba a vácuo, antes da sua utilização.

5.1.5. Tipo de coluna

A nossa opção foi pela coluna de troca iônica de Cálcio, que leva a uma melhor separação em relação às colunas de amino. A temperatura para que a coluna tivesse uma melhor separação de substâncias foi de 90°C .

5.1.6. Tipo de detector

O detector por índice de refração foi o escolhido. Trata-se de um detector com boa sensibilidade para a dosagem de carboidratos.

5.2. Resultados da Investigação

5.2.1. Considerações iniciais

Não há dúvida que a glicose é o carboidrato mais importante para o metabolismo fetal e neonatal, produzindo energia utilizada principalmente pelo sistema nervoso central. O nível de glicose é crítico para as necessidades energéticas do cérebro (Ogata, 1986).

A glicose entra na circulação fetal através de difusão facilitada e seu metabolismo é ajustado através de hormônios, principalmente a insulina (Battaglia & Meschia, 1978). O terceiro trimestre da gestação é o período para o maior crescimento fetal e para a deposição de estoques energéticos para serem usados durante a vida neonatal. A insulina e o glucagon, que são os principais hormônios para a regulação da glicose aparecem no plasma fetal por volta da décima-segunda semana de gestação. Porém tais hormônios são mais importantes para estimular o crescimento e para a indução das enzimas da gliconeogênese do que para a regulação dos estoques de energia durante a vida fetal (Ogata, 1987).

Entretanto a dieta de recém-nascido e de lactentes é constituída não apenas de glicose proveniente do metabolismo da lactose, mas também por outros carboidratos cujos metabolismos são poucos estudados em recém-nascidos, o que se comprova pelo baixo número de publicações a seu respeito. Entre estes açúcares ressaltamos a galactose, constituinte de 50% da lactose do leite fornecido aos recém-nascidos e a frutose, constituinte de 50% da sacarose fornecida a lactentes, além de estar presente em frutas e verduras. A época de introdução de alimentos que contenham frutose geralmente ocorre entre o quarto e o sexto mês de vida, em crianças amamentadas ao seio materno (Dennison, 1996).

Algumas tentativas têm ocorrido na literatura de ministrar a galactose ou a frutose como substitutas da glicose para pacientes intolerantes à glicose e com menor sensibilidade hepática à glicose (Beyress & Rautenbach, 1973).

A frutose já foi empregada na dieta de diabéticos, uma vez que a mesma não depende de insulina para seu metabolismo (Minkowsky, 1893).

A primeira indagação que tivemos foi em relação aos níveis normais de frutose sangüínea encontrada nos recém-nascidos a termo. Não há dados claros sobre níveis sangüíneos de frutose em recém-nascidos, principalmente por métodos sensíveis como é a cromatografia líquida de alta resolução.

Outra indagação surgida foi o fato de que o leite materno parece não conter frutose e, portanto o recém-nascido em aleitamento materno não recebe frutose de fonte exógena. Portanto, com esta pesquisa, procuramos investigar os níveis de frutose em recém-nascidos não recebendo frutose com a dieta e procurar relacionar com outros dois carboidratos intimamente relacionados com seu metabolismo, a saber, glicose e sorbitol.

Partimos também do pressuposto que se houver algum papel para a administração da frutose para recém-nascidos há necessidade de sabermos quais os níveis encontrados no sangue nas condições próximas ao ideal, Isto é, em recém-nascidos de termo com pesos adequados, de parto normal, sem depressão neonatal e alimentados ao seio materno. O momento da coleta, isto é, com 48 horas de vida, foi considerado em função de que neste período já teriam ocorrido as adaptações no metabolismo da glicose, estando seus níveis em patamares normais e estáveis.

5.2.2. Concentrações de frutose no sangue.

Na literatura científica não existe consenso em relação aos níveis sangüíneos de frutose considerados normais em seres humanos adultos. A variação dos valores encontrados na literatura é grande e dependente em grande parte do método utilizado. O mesmo pode ser dito em relação aos níveis normais de sorbitol.

Para o completo entendimento do papel da frutose e do sorbitol é necessário ter conhecimento dos níveis normais encontrados no ser humano. Para que isso ocorra é necessário à utilização de métodos precisos e sensíveis. A dosagem desses açúcares nos fluídos orgânicos tem sido dificultada pelas baixas concentrações encontradas. Nos métodos quantitativos de cromatografia gasosa a análise é prejudicada pelas altas concentrações de D-glicose nas amostras.

A concentração “normal” de frutose nos fluídos orgânicos ainda não foi definida. Pitkänen e Kanninen (1994) reuniram várias pesquisas em plasma e soro humano, nas quais houve variações nos métodos de dosagem (Quadro 2). Podemos observar que também os resultados são variáveis, desde $3,3 \pm 1,4\text{mg/dl}$ até $18,2 \pm 16,6\text{mg/dl}$.

Método	Frutose	Referência
Enzimático	$86 \pm 44\mu\text{mol}$	Liu et al., 1989.
Cromat. Líquida	$8,7 \pm 2,8\text{mg}$	Jolley et al., 1970.
Cromat. Gas.	$5,6 \pm 0,1\text{mg}$	Aloia, 1973.
Cromat. Gas.	$4,7 \pm 1,9\text{mg}$	Yoshioka et al., 1984.
Cromat. Gas.	$18,2 \pm 16,6\text{mg}$	Kusmierz et al., 1989.
Cromat. Gas. Espect. Massa	$18,3 \pm 7,6\mu\text{mol}$ $3,3 \pm 1,4\text{mg}$	Pitkänen & Kanninen, 1994.

Quadro 2. Relatos de concentrações normais de frutose no plasma e soro humano (modificado de Pitkänen & Kanninen, 1994)

Não encontramos muitos trabalhos mostrando os níveis de frutose no sangue de humanos. Um trabalho realizado em 1967 e publicado em 1968, feito por Macdonald & Turner, em Londres, correlacionou os níveis plasmáticos de frutose em adultos sadios após a ingestão de sacarose. Nesse trabalho a frutose basal variou de 2 a 5mg/100ml, atingindo níveis de até 8 a 9mg/100ml após a sobrecarga de sacarose. Nesse trabalho a técnica utilizada foi a enzimática, usando o método de Roe, de 1934 (Macdonald & Turner, 1968).

Uma pesquisa realizada em 1970 chegou a valores de frutose sérica determinada por cromatografia líquida de alta resolução. A média encontrada de frutose no sangue foi de $0,87\text{mg}/100\text{ml} \pm 0,28$ com um desvio padrão de $\pm 32\%$. O grupo de estudo utilizado foi composto de oito homens adultos, com idade entre 25 e 40 anos, sem doença prévia e/ou uso de medicação (Jolley et al., 1970).

Em outro estudo com pacientes normais e, diabéticos e urêmicos adultos, com idade média de $57,2 \pm 15,6$ anos. Os níveis de frutose sérica nos pacientes normais variaram de 0,40 a 0,79mg/100ml em 32 pacientes, com média de 0,56mg/100ml. No grupo formado por pacientes diabéticos a frutose variou de 0,09 a 1,0mg/100ml, com média de 0,53mg/100ml. Nesse mesmo estudo foram obtidos os valores de sorbitol sérico e eles, nos pacientes normais, variaram de 0,09 a 0,43mg/100ml, com média de 0,24mg/100ml. Nos pacientes diabéticos, os níveis de sorbitol variaram de 0,08 a 1,31mg/100ml, com média de 0,56mg/100ml (Aloia, 1973).

Em análises de polióis no plasma de 14 voluntários adultos, feita em 1989 por Kusmierz e colaboradores, usando a cromatografia gasosa, os níveis de frutose variou de $18,2 \pm 16,6$ mg/dl (Kusmierz et al., 1989).

Após extensa revisão da literatura em relação a valores de frutose sangüínea em recém-nascidos não encontramos valores que possam ser considerados normais. A maioria dos estudos mostra valores sangüíneos de frutose após sobrecarga de frutose. Em algumas espécies de mamíferos, especialmente nos pertencentes à ordem dos ungulados, os níveis de frutose sangüínea no feto podem atingir valores 3 a 4 vezes mais elevados que a glicose (Battaglia & Meschia, 1978). No feto humano não encontramos níveis elevados de frutose (Jeffery & Jörnvall, 1983).

Os valores encontrados na nossa pesquisa variaram de 1,85mg/dl a 5,29mg/dl, não estando muito diferentes dos observados na literatura. Evidentemente os maiores níveis de glicose em relação à frutose devem-se ao seu débito hepático que corresponde no recém-nascido a 3 – 6mg/kg/min e pela sua grande importância para o SNC.

5.2.3. Concentrações sangüíneas de sorbitol

Assim como para a frutose, não encontramos na literatura científica um consenso em relação a valores sangüíneos de sorbitol a serem considerados normais.

Esses valores são influenciados em grande parte pelo método utilizado para a dosagem, sendo ampla a variação.

Pitkänen, em 1972, segundo Aloia, estabeleceu valores “normais” para adultos. Esses valores foram levemente mais elevados que os observados por Aloia em 1973. Os valores variaram, em 32 adultos normais, de 0,08 a 0,43 mg/100ml. Ambos os autores usaram a cromatografia gasosa para a dosagem (Aloia, 1973).

Bässler e colaboradores em 1978, utilizando-se de um método enzimático, obtiveram valores que variaram de 04 a 1,2 mmol/l com um coeficiente de variação menor que 4% (Bässler et al., 1978).

Em uma pesquisa usando o plasma de 10 indivíduos normais com idade variando entre 22 e 63 anos, Shetty e colaboradores, em 1995, chegaram a valores de $0,193 \pm 0,071 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (Shetty et al., 1995).

Os valores obtidos em nossa pesquisa variaram de 0,22 mg/dl a 3,25 mg/dl.

5.2.4. Concentrações sangüíneas de glicose

A glicose tem papel principal no metabolismo energético dos mamíferos e pode ser armazenada na forma de glicogênio, gordura e proteína. A glicose é fonte imediata de energia e sua oxidação fornece 38 moles de ATP para cada mol de glicose oxidada. É o principal substrato energético para o cérebro e é responsável por todo o consumo de O_2 do cérebro.

Os níveis médios de glicose encontrados são compatíveis com os valores considerados normais definidos pela literatura. Os valores de normalidade para a glicose ainda não são consenso geral. Srinivasan observou que os níveis são superiores a 45mg/dl após 24 horas de vida. Os valores encontrados em nossa pesquisa foram de 55,44mg/dl ($\pm 10,10$), em recém-nascidos com 48 horas de vida, amamentados ao seio materno, 30 minutos após a mamada (Srinivasan, 1986).

5.2.5. Papel da frutose em humanos

A frutose de origem exógena tem a sua via metabólica bem conhecida. Após a sua absorção, a frutose entra na circulação e chega até o fígado onde será metabolizada. A sua metabolização envolve uma via específica. Através dessa via, compostos fosforilados de frutose serão produzidos. O destino dessas trioses fosforiladas é determinado principalmente pelo potencial redox e potencial de fosfato da célula hepática. Sob condições normais, a frutose é rapidamente fosforilada e liberada do fígado na forma de glicose. Uma parte da frutose é diretamente convertida em glicogênio, lactato e acetato os quais podem ser utilizados para síntese de ácidos graxos e parte é oxidada até CO_2 (Froesch, 1976).

O metabolismo da frutose e do sorbitol é caracterizado por uma fosforilação rápida e não submetida a controle. Há um acúmulo de ésteres de fosfato orgânico, depleção de compostos de fosfato ricos em energia e uma rápida produção de produtos finais como glicose, lactato e triglicérides (Sestoff, 1985).

No recém-nascido amamentado com leite materno e que teoricamente não recebe frutose por via oral, o encontro de frutose no sangue reflete a produção endógena de frutose.

A produção de frutose endógena é feita pela via do sorbitol, onde glicose é convertida em sorbitol e posteriormente em frutose. A conversão de glicose em frutose pela via do sorbitol é favorecida pela elevação de glicose e altas concentrações de ATP e por baixas concentrações de ADP e de NADH, o que implica em uma glicólise eficiente e uma respiração adequada, quando há amplo aporte de glicose (Jeffery & Jörnvall, 1983).

O leite materno não parece conter quantidades importantes de sorbitol, onde é encontrado em concentrações mínimas e que provavelmente não terão importância nos níveis sanguíneos de sorbitol no recém-nascido (Huisman et al.1996).

O primeiro passo da via do sorbitol é a conversão de glicose em sorbitol pela aldolase-redutase e NADPH. A oxidação do sorbitol pela sorbitol-desidrogenase e NAD^+ dá origem à frutose. Esse desvio do metabolismo da glicose, via sorbitol, tem uma função de óxido-redução (redução de NAD^+ e oxidação de NADPH) (Jeffery & Jörnvall, 1983).

Oxidação é definida quimicamente como a perda de elétrons e a redução como ganho de elétrons. As reações de óxido-redução, nas quais não há participação de oxigênio, são chamadas de desidrogenações (Lehninger, 1997).

As reações de óxido-redução são sempre acompanhadas de um aceptor de elétrons, além das enzimas catalizadoras. Existem dois aceptores principais, também chamados de coenzimas: a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP^+) e a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD^+). Ambas são formadas no organismo a partir da vitamina niacina. Normalmente, as desidrogenases que são ligadas ao NAD catalizam reações de oxi-redução nas vias oxidativas do metabolismo, especialmente na glicólise, no ciclo do ácido cítrico e na cadeia respiratória. As desidrogenases ligadas ao NADP são geralmente encontradas nas sínteses redutivas, como nas vias extramitocondriais de síntese de ácidos graxos e esteróides (Lehninger, 1997).

Podemos observar a importância das reações de oxi-redução no metabolismo da frutose quando estudamos as complicações dos diabetes. No estado hiperglicêmico, que os diabetes provoca, há um grande fluxo de glicose através da via do sorbitol. A oxidação do sorbitol até a frutose, via sorbitol desidrogenase, leva a uma diminuição na relação de NAD^+/NADH do citosol. O equilíbrio óxido-redutivo é mantido, até certo ponto, através do acoplamento com a redução do piruvato em lactato. Em estados hiperglicêmicos, entretanto, o grande aumento nos níveis de NADH tendem a inibir a glicólise na etapa da formação do 1,3 difosfoglicerato a partir do gliceraldeído-3-fosfato, com isso limitando a oferta de piruvato para a regeneração do NAD^+ (Lee & Chung, 1999) (Figura 10).

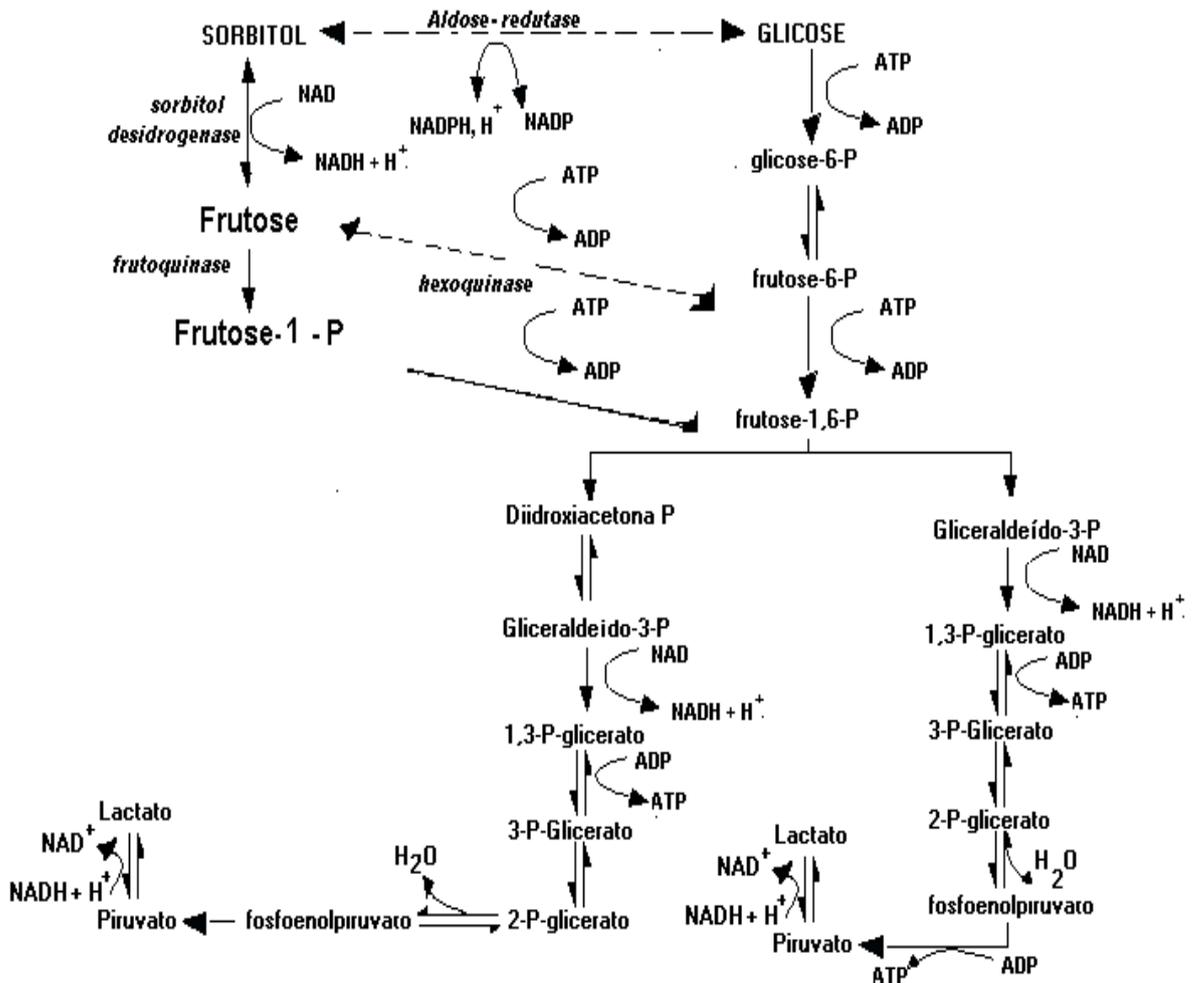


Figura 10 - Oxi-redução do sorbitol e da frutose e inter-relação com a glicólise (Modificado de Dale, 1977).

Após a nossa investigação, que comprova a presença de frutose no sangue de recém-nascidos que não recebem frutose exógena, levantamos algumas suposições.

Uma suposição é que a via do sorbitol, que é provavelmente a via de produção da frutose que encontramos, tem uma função de desidrogenase, com produção de NADH e NADP. A produção dessas coenzimas tem uma importância para o equilíbrio oxi-redutivo do citosol. Outra função seria a produção de precursores fosforilados para a síntese de ácidos graxos.

5.3. Relação frutose-sorbitol

A oxidação do sorbitol só pode ser alcançada após a sua conversão em frutose ou glicose. A maioria dos estudos sugere que o sorbitol em humanos sem doença seja convertido em frutose, primariamente e apenas uma pequena porção é metabolizada diretamente até glicose (Wang & Van Eys, 1981).

O sorbitol não consegue atravessar alguns tipos de membranas celulares, particularmente o cristalino, nervo ciático e papila renal, acumulando-se no interior do citosol. Um aumento acentuado da concentração desse poliol no interior da célula pode levar a um desequilíbrio no balanço osmótico, causando um influxo de água intracelular e conseqüentemente, edema. A ruptura celular pode ocorrer. Tais eventos são importantes em estados patológicos como a hiperglicemia observada nos diabetes. Nessa situação, o acúmulo de poliol (sorbitol) acontece devido ao desequilíbrio na via do sorbitol (O'Brien et al., 1983).

Os resultados observados na nossa pesquisa, onde observamos uma correlação positiva, embora fraca, entre os níveis de sorbitol e os níveis de frutose sangüínea, confirmam que os metabolismos dessas duas substâncias estão intimamente ligados e interdependentes.

5.4. Considerações finais

Ao analisarmos os resultados de nossa pesquisa, podemos concluir que ela foi útil na determinação de valores "normais" para frutose e sorbitol em recém-nascidos a termo com pesos adequados para a idade gestacional, sob aleitamento materno exclusivo. Isso pode ter conseqüências em utilizações futuras de sorbitol e frutose em recém-nascidos, bem como para a investigação de erros inatos associados a esses açúcares.

6. Conclusões

1. A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) revelou-se um método eficaz e sensível para a determinação de frutose em recém-nascidos
2. Os níveis sanguíneos de frutose em recém-nascidos a termo e com pesos adequados para a idade gestacional com 48 horas de vida, após 30 minutos da mamada e sob aleitamento materno exclusivo foram de 3,67mg/dl (com $\pm 0,93$), e valores mínimos de 1,85 mg/dl e máximos de 5,29mg/dl.
3. Houve correlação significativa entre os valores encontrados de sorbitol e de frutose, sugerindo que há realmente uma relação entre os seus metabolismos.
4. Os níveis sanguíneos de glicose encontrados nos recém-nascidos a termo com pesos adequados para a idade gestacional após 30 minutos da mamada, sob aleitamento materno exclusivo e com 48 horas de vida foram de 55,43mg/dl ($\pm 8,7$) e encontram-se dentro dos padrões de normalidade.
5. A adaptação do método para o recém-nascido mostrou-se eficaz, evidenciada pela boa recuperação do padrão interno da amostra, o manitol, que foi em média de 87,82% ($\pm 13,15$).

7. Referências bibliográficas*

- ALOIA, J.F. Monosaccharides and polyols in diabetes mellitus and uremia. **J. Lab. Clin. Med.**, v.82, p.809-17, 1973.
- APGAR, V. The Newborn (Apgar) scoring system. Reflections and advice. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 13, p.645-50, 1966.
- AUGSTEN, L., BOWEN, R.A. Hexose transporters. In: **Glossary. Biomedical hypertexts**. Disponível em: <<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/index.html>>. Acesso em: 20 jul. 1999.
- BAKER, L., WINEGRAD, A.I. Fasting hypoglycaemia and metabolic acidosis associated with deficiency of hepatic fructose-1,6-diphosphatase activity. **Lancet.**, v. 2, p.13-6, 1970.
- BÄSSLER, K.H., WAGNER, K., SCHÖNERSTEDT, B. Enzymatic determination of xylitol and sorbitol. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v.6, p.547-50, 1978.
- BATTAGLIA, F., MESCHIA, G. Principal substrates of fetal metabolism. **Physiol. Rev.**, v.58, p.499-527, 1978.
- BAUR, H., HELDT, H.W. Transport of hexoses across the liver-cell Membrane. **Eur. J. Biochem.**, v.74, p.397-403, 1977.
- BERGSTRÖM, K., BLOMSTRAND, R., JACOBSON, S. Long-term complete intravenous nutrition in man. **Nutr. Metab.**, v.14, p.S118-49, 1972.
- BERNT, E., BERGMAYER, H.U. D-Fructose. In: BERGMAYER, H.U. (Ed.) **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1974. p.1304-19.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 1997. 240p.

- BEYRESS, K., RAUTENBACH, M. Utilization and turnover rate of fructose during continuous intravenous infusion in pre-term and term newborns in dependence on age. **Biol. Neonate** , v.24, p.330-43, 1973.
- BLAKEMORE,S.J., ALEDO, J.C., JAMES, J., CAMPBELL, F.C., LUCOQ, J.M., HUNDAL, H.S. The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum. **Biochem. J.**, v.309, p.7 12, 1995.
- BOSSOLAN, G. **Determinação dos níveis sanguíneos de galactose em recém-nascidos de termo com pesos adequados para a idade gestacional com 48 horas de vida pelo método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)**. Botucatu, 2000. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.
- BRACHET, E. Presence of the complete sorbitol pathway in the human normal umbilical cord tissue. **Biol.Neonate.**, v.23, p.314-23, 1973.
- BUCHS, A.E., SASSON, S., JOOST, H.G., CERASI, E. Characterization of GLUT5 domains responsible for fructose transport. **Endocrinology.**, v.139, p.827-31, 1998.
- BURANT, C.F., TAKEDA, J., BROTLAROCHE, E., BELL, G.I., DAVIDSON, N. O. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. **J Biol. Chem.** ,v.267, p.523-26, 1992.
- BYE, P.A. The utilization and metabolism of intravenous sorbitol. **Br. J. Surg.**, v.56, p.653-6, 1969
- CAPURRO, H., KONICHEZKY,S., FONSECA, D., CALDEYRO-BARCIA, R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. **J. Pediatr**, v. 93, p. 120-2, 1978.
- CHINARD, F.P., DANESINO, V., HARTMAN, W.L., HUGGET, A.S., PAUL, W., REYNOLDS, S.R.M. The transmittion of hexoses across the placenta in the human and the rhesus monkey. **J. Physiol.**, v.132, p.289-303, 1956.
- CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. São Paulo: Edgard Bliicher, 1998.179p.

- CLARK, J.H., BULLOCK, L., FITZGERALD, J.F. Dietary fructose in the management of intractable diarrhea of infancy. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.5, p.81-6, 1986.
- CLEMENTS, R.S., MORRISON, A.D., WINEGRAD, A.I. Polyol pathway in aorta .Regulation by hormones. **Science.**, v166, p.1007-8.1969.
- COARSE, J.F., CARDONI, A.A. Use of fructose in the treatment of acute alcoholic intoxication. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v.32, p.518-9, 1975.
- CONCHA, I.I, VELÁSQUEZ, F.V., MARTÍNEZ, J.M., ANGULO, C., DROPELMANN, A., REYES, A.M., SLEBE, J.C., GOLDE, D.W. Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose. **Blood.**, v.89, p.4190-95, 1997.
- CORPE, C.P., BURANT, C.F., HOEKSTRA, J.H. Intestinal fructose absorption: Clinical and molecular aspects. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 28, p. 364-72, 1999.
- DALE, G. Biochemical consequences of intravenous nutrition in the newborn. **Adv. Clin. Chem.**, v.19, p.207-49, 1977.
- DAVIES, P.M., SIMMONDS, H.A., SINGER, B., MANT, T.G., ALLEN, E.M., VASSOS, A.B., HOUNSLOW, N.J. Plasma uridine as well as uric acid is elevated following fructose loading. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.431, p.31-5, 1998.
- DELASCIO, D. GUARIENTO, A. Diagnóstico em obstetrícia. In: BRIQUET, R. **Obstetrícia normal Briquet**. São Paulo: Sarvier, 1994. p. 271-81.
- DENNISON, B.A., Fruit juice consumption by infants and children: a review. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.15, p.4s-10s, 1996.
- ENCICLOPÉDIA MIRADOR INTERNACIONAL: Açúcar. São Paulo: Encyclopedia Britannica do Brasil, 1976. 2 v.
- FÖSTER, H., BOECKER, S., DUDZIAK, R., STEUER, A. Long-term parenteral nutrition with fructose in intensive care patients. **Nutr. Metabol.**, v.21, p.124-7, 1977.
- FROESCH, E.R. Disorders of fructose metabolism. **Clin. Endocrinol. Metab.**, v.5, p.599-611, 1976.

- GOULD, G.W., HOLMAN, G.D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. **Biochem. J.**, v.295, p. 329-41, 1993.
- HAHN, T., BARTH, S., WEISS, U., MOSGOELLER, W., DESOYE, G. Sustained hyperglycemia in vitro down-regulates the GLUT1 glucose transport system of cultured human term placental trophoblast: a mechanism to protect fetal development? **FASEB J.**, v.12, p.1221-31, 1998.
- HALLFRISCH, J. Metabolic effects of dietary fructose. **FASEB J.**, v. 4, 2652-60, 1990.
- HAY JR, W.W. Regulation of placental metabolism by glucose supply. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.365-75, 1995.
- HERMAN, R.H., STIFEL F.B., GREENE, H.L., HERMAN, Y.F. Intestinal metabolism of fructose. **Acta Med. Scand. Suppl.**, v.542, p.19-25, 1972
- HOEKSTRA, J.H., VAN DEN AKER, J.H.L. Facilitating effect of amino acids on fructose and sorbitol absorption in children. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.23, p.118-24, 1996.
- HU, O.Y., HU, T.M., TANG, H.S. Determination of galactose in human blood by high-performance liquid chromatography: comparison with an enzymatic method and application to the pharmacokinetic study of galactose in patients with liver dysfunction. **J. Pharm. Sci.**, v.84, p.231-5,1995.
- HUISMAN, M., VAN BEUSEKOM, C.M., LANTING C. I., NIJEBOER, H.J., BOERMA, E.R. Triglycerides, fatty acids, sterols, mono- and disaccharides and sugar alcohols in human milk and current types of infant formula milk. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.50, p.255-60, 1996.
- JEFFERY, J., JÖRNVALL, H. Enzyme Relationships in a sorbitol pathway that bypasses glycolysis and pentose phosphates in glucose metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.80, p. 901-5, 1983.
- JOLLEY, R.L., WARREN, K.S., SCOTT, C.D., JAINCHILL, J.L., FREEMAN, M.L. Carbohydrates in normal urine and blood serum as determined by high-resolution column chromatography. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.53, p. 793-802, 1970.

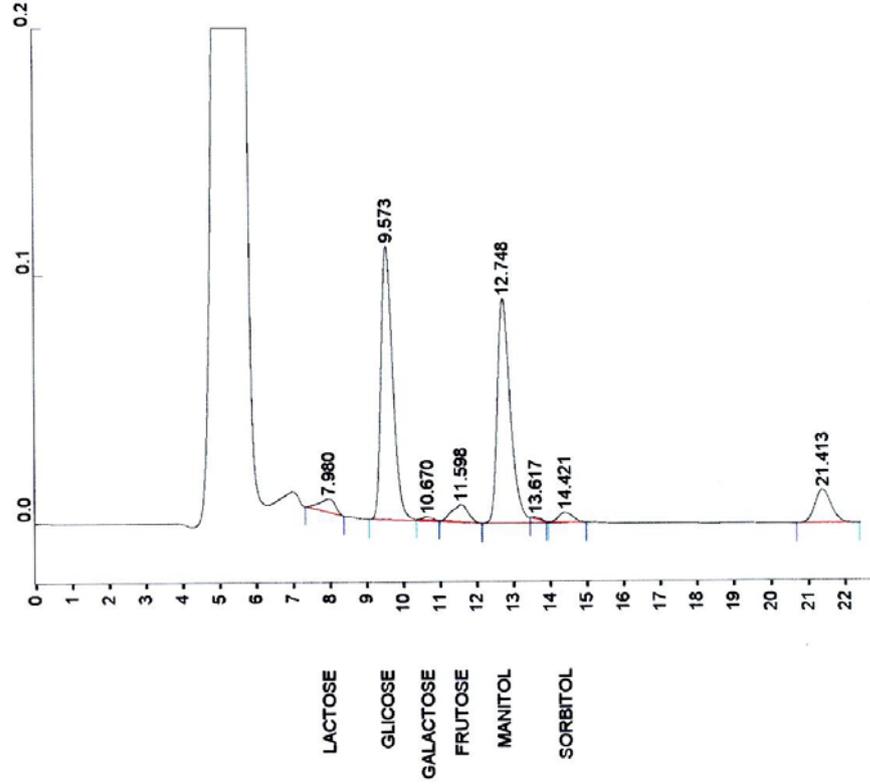
- KLIEGMAN, R.M. Defects in fructose metabolism. In: NELSON, W.E., BERHMAN, R.E., KLIEGAMN, R.M., ARVIN, A.M.(Eds.) **Nelson Textbook of Pediatrics**. 15.ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1996. p.387-8.
- KRISTIANSEN, S., DARAKHSHAN, F., RICHTER E.A., HUNDAL H.S. Fructose transport and GLUT5 protein in human sarcolemmal vesicles. **Am. J. Physiol.**, v.273, p. E-543-8, 1997.
- KUSMIERZ, J., DEGEORGE, J.J., SWEENEY, D., MAY, C., RAPOPORT, S.I. Quantitative analysis of polyols in human plasma and cerebrospinal fluid. **J. Chromatogr.** , v.497, p.39-48, 1989.
- LANZA, A. Monossacarides in amniotic fluid. **Minerva Ginecol.**, v.19, p. 1072-3, 1970.
- LEE, A.Y.W., CHUNG, S.S.M. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **FASEB J.**, v. 13, p.23-30, 1999.
- LEE, H. A., MORGAN, A.G., WALDRAM, R., BENNETT, J. Sorbitol, some aspects of its metabolism and role as an intravenous nutrient. In: WILKINSON, A.W.(Ed.) **Parenteral nutrition**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1972. p. 121-37.
- LEHNINGER, A.L, NELSON, D.L.,COX,M.M. Carboidratos. In **Princípios de Bioquímica**. 2ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 222-37.
- LIU, S. Q., DAS, B., SRIVASTAVA, S.K. A micromethod for the determination of fructose in human erythrocytes and plasma. **Clin. Chim. Acta.**, v. 181, p. 219-22, 1989.
- LUBCHENCO, L.O. Assessment of gestational age and development of birth. **Pediatr. Clin. North. Am** ,v.17, p.125-45, 1970.
- MACDONALD, I., TURNER, L.J. Serum-fructose levels after sucrose or its constituent monosaccharides. **Lancet.**, v.1, p. 841-3, 1968.
- MARKOV, A.K., BRUMLEY, M.A., FIGUEROA, A, SKLETON, T.N., LEHAN, P.H. Hemodynamic effects of fructose-1,6-diphosphate in patients with normal and impaired left ventricular function. **Am. Heart. J.**, v. 133, p.541-9, 1997.

- MCCANN, M.L., CHEN, C.H., KATIBAK, E.B., KOTCHEN, J.M., LIKELY, B.F., SCHWARTZ, R. Effects of fructose in infants of diabetic mothers. **N. Engl. J. Med.**, v.275, p.1-7, 1966.
- MCGOWAN, J.E., ALDORETTA, P.W., HAY JR, W.W. Contribution of fructose and lactate produced in placenta to calculation of fetal glucose oxidation rate. **Am. J. Physiol.**, v.269, 5pt1, p.E-834-9, 1995.
- MINKOWSKY, O. Untersuchungen über den diabetes mellitus nach extirpation des pankreas. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.**, v.31, p.85-189, 1893.
- MIZUGUCHI, H., COOK, P.F., TAI, C.H., HASEMANN, C.A., UYEDA, K. Reaction mechanism of fructose-2,6-bisphosphatase. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 2166-75, 1999.
- NIXON, D. A. The determination of fructose in biological fluids using anthrone. **Clin. Chim. Acta**, v.26, p.167-9, 1969.
- O'BRIEN, M.M., SCHOFIELD, P.J., EDWARDS, M.R. Polyol-pathway enzymes of human brain. **Biochem. J.**, v.211, p.81-90, 1983.
- OGATA, E. S. Carbohydrate metabolism in the fetus and neonate and altered neonatal glucoregulation. **Pediatr. Clin. North Am.**, v.33, p.25-45, 1986.
- PERHEENTUPA, J., RAVIO, K. Fructose-induced hyperuricemia. **Lancet.**, v.2, p.528-31, 1967.
- PERMAN, J.A. Digestion and absorption of fruit juice carbohydrates. **J. Am. Coll.**, v.15, p. 12s-7s, 1996.
- PITKÄNEN, E., KANNINEN, T. Determination of mannose and fructose in human plasma using deuterium labelling and gas chromatography/mass spectrometry. **Biol. Mass. Spectrom.**, v.23, p.590-5, 1994.
- PRIBYLOVÁ, H., KIMLOVÁ, I., STROUFOVÁ, A. The effect of intravenous fructose and glucose on metabolism and plasma insulin levels in newborn infants. **Biol. Neonate.**, v.23, p. 205-13, 1973
- PRIBYLOVÁ, H., MELICHAR, V., SABATA, V. The effect of prenatal fructose infusions upon metabolic condition of the newborn. **Biol. Neonate.**, v.32, p.108-12, 1977.

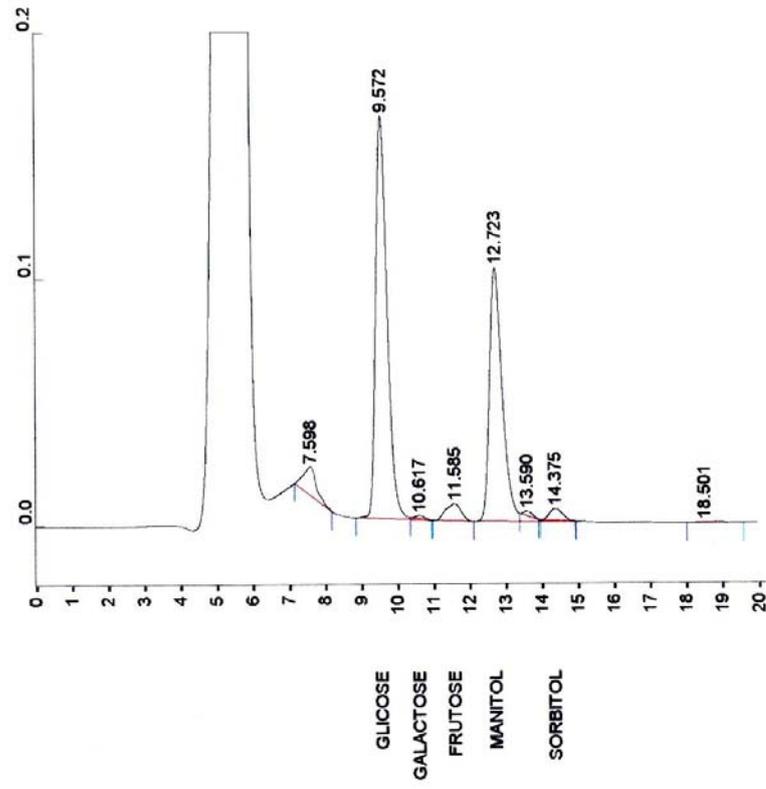
- RAND, E.B., DEPAOLI, A.M., DAVIDSON, N.O., BELL, G.I., BURANT, C.F. Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. **Am. J. Physiol.**, v.264, p. G1169-76, 1993.
- REID, N. A., GRIBBLE, S.M., BOYD, C. A. R., SHIRAZI-BEECHEY, S.P. Immunodetection of facilitative glucose-transporter proteins in the human placental syncytiotrophoblast brush-border and basal membranes. **J. Physiol.**, v. 482P, p.46, 1995. [Abstract]
- REISER, S., POWELL, A.S., SCHOLFIELD, D.J., PANDA, P. Day-long glucose, insulin, and fructose responses of hyperinsulinemic and nonhyperinsulinemic men adapted to diets containing either fructose or high-amylose cornstarch. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 50, p. 1008-14, 1989.
- ROIG, T., BARTRONS, R., BERMÚDEZ, J. Exogenous fructose-1,6-diphosphate reduces K⁺ permeability in isolated hepatocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. C473-8, 1997.
- RUMESSEN, J.J. Fructose and related food carbohydrates. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 27, p.819-28, 1992.
- SESTOFF, S. An evaluation of biochemical aspects of intravenous fructose, sorbitol, and xylitol administration in man. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, v. 29, p.19-29, 1985.
- SHAH, S.W., ZHAO, H., LOW, S.Y., MCARDLE, H.J., HUNDAL, H.S. Characterization of glucose transport and glucose transporters in the human choriocarcinoma cell line, bewo. **Placenta**, v. 20, p. 651-9, 1999.
- SHARMA, J.N., SAXENA, S., SHARMA, U. Standard curves for mid arm circumferences and mid arm/head circumference ration in newborns. **Indian J. Pediatr.**, v.57, p.389-93, 1990.
- SHERMAN, M.P. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy [letter]. **Pediatrics.**, v.102 (3pt1), p.662, 1998.
- SHETTY, H.U., SCHAPIRO, M.B., HOLLOWAY, H.W., RAPOPORT, S.I. Polyol profiles in down syndrome. Mio-inositol, specifically, is elevated in the cerebrospinal fluid. **J. Clin. Invest.**, v.95, p. 242-6, 1995.

- SHI, X., SCHEDL, H.P., SUMMERS, R.M., LAMBERT, G.P., CHANG, R.T., XIA, T., GISOLFI, C.V. Fructose transport mechanism in humans. **Gastroenterology**, v.113, p. 1171-9, 1997.
- SILLERO, A., SILLERO, M.A.G., SOLS, A. Development of the enzymes of fructose and glyceraldehyde metabolism in liver **Enzym. Biol. Clin.**, v.11, p.563-6, 1970.
- SOLA, A., BERRIOS, M., SHELDON, R.A., FERRIERO, D.M., GREGORY, G.A. Fructose-1,6-bisphosphate after hypoxic ischemic injury is protective to neonatal rat brain. **Brain Res.**, v. 741, p.294-9, 1996.
- SOMMER-DAUPHANT, A.M., CHAMBOM, P., CHABERT, J.M. Conversion of sorbitol to mannitol when used parenterally. **Clin. Chim. Acta.**, v. 67, p. 325-8, 1967.
- SPARKS, J.W. Galactose and fructose. In: POLIN, R.A., FOX, W.W. **Fetal and neonatal physiology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 384-90.
- SRINIVASAN, G., PILDES, S.P., CATTAMANCHI, G., VOORA, S., LILIEN, L.D. Plasma glucose values in normal neonates: a new look. **J. Pediatr.**, v.109, p.114-7, 1986.
- STREINER, D.L., NORMAN, G.R. **Biostatistics: the bare essentials**. St.Louis: Mosby-Year Book, 1994. p.260.
- UUSITUPA, M.I. Fructose in the diabetic diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.59, p. 753s-7s, 1994.
- VAN SCHAFTINGEN, E. Decouverte et rôle du fructose-2,6-bisphosphate. **Acta Gastroenterol. Belg.**, v. 51, p. 141-6, 1988.
- WANG, Y.M., VAN EYS, J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. **Ann. Rev. Nutr.**, v.1, p. 437-75, 1981.
- YOSHIOKA, S., SAITOH, S., SEKI, S, SEKI, K. Concentrations of non-glucose polyols in serum and cerebrospinal fluid from apparently healthy adults and children. **Clin. Chem.**, v. 30, p. 188-91, 1984.

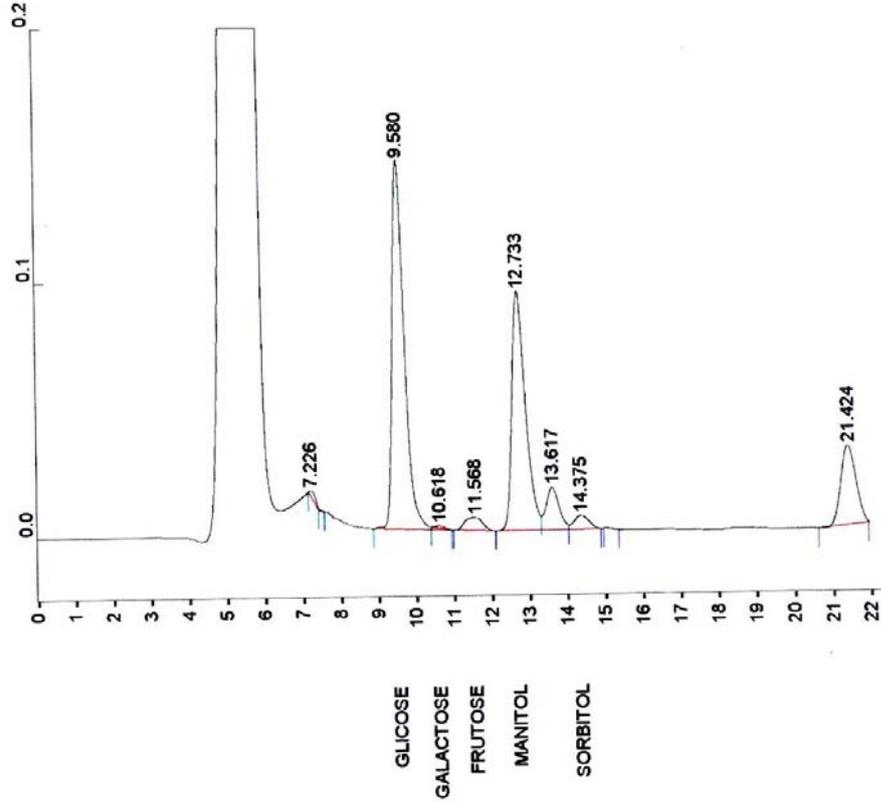
ANEXO 17 - Cromatograma do Recém-nascido 11.



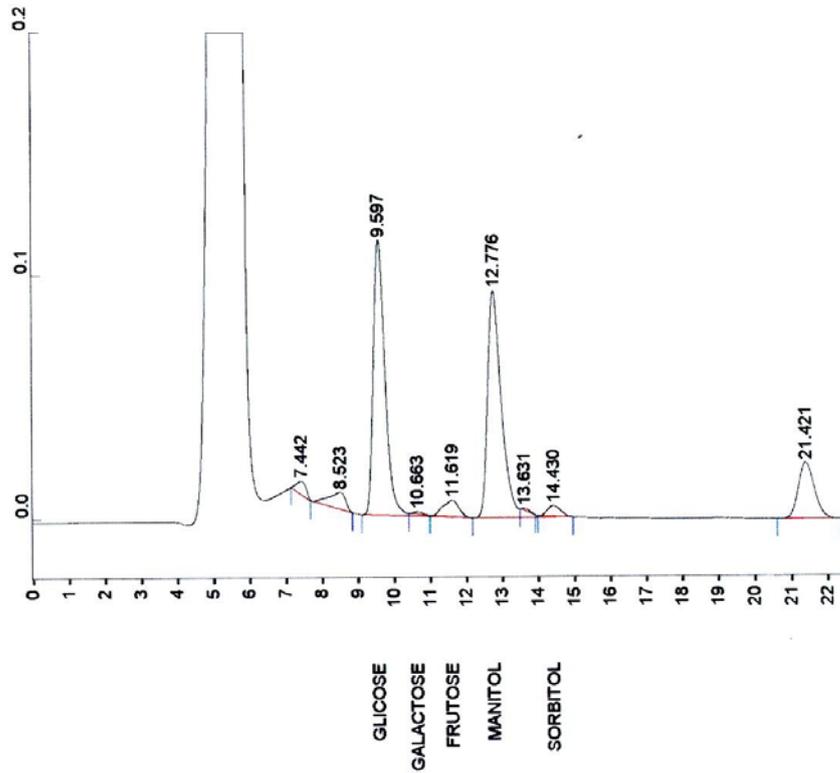
ANEXO 18 - Cromatograma do Recém-nascido 12.



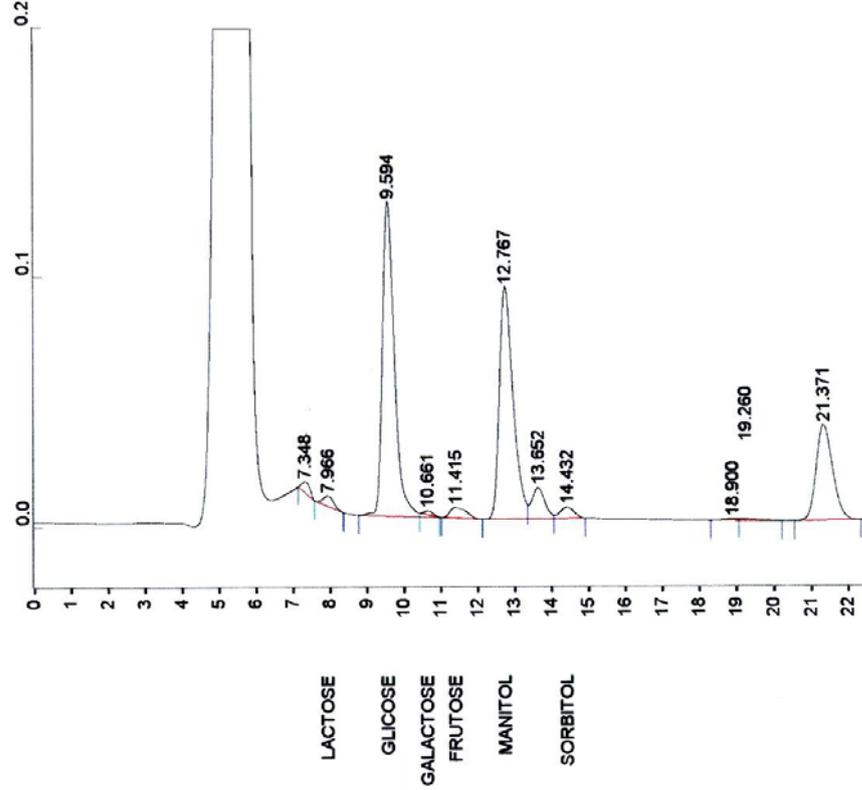
ANEXO 19 - Cromatograma do Recém-nascido 13.



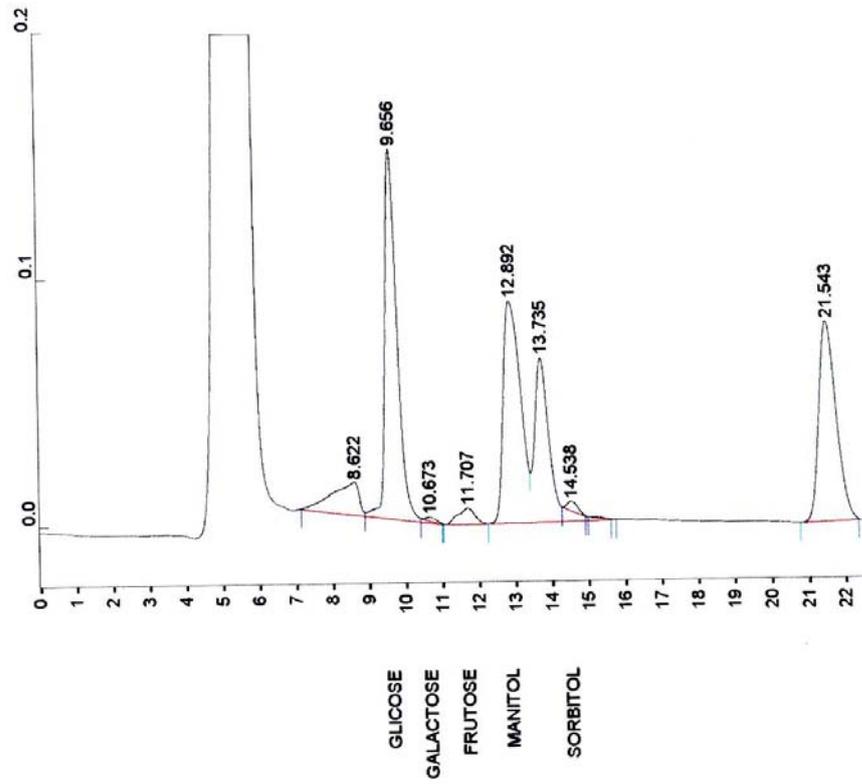
ANEXO 20 - Cromatograma do Recém-nascido 14.



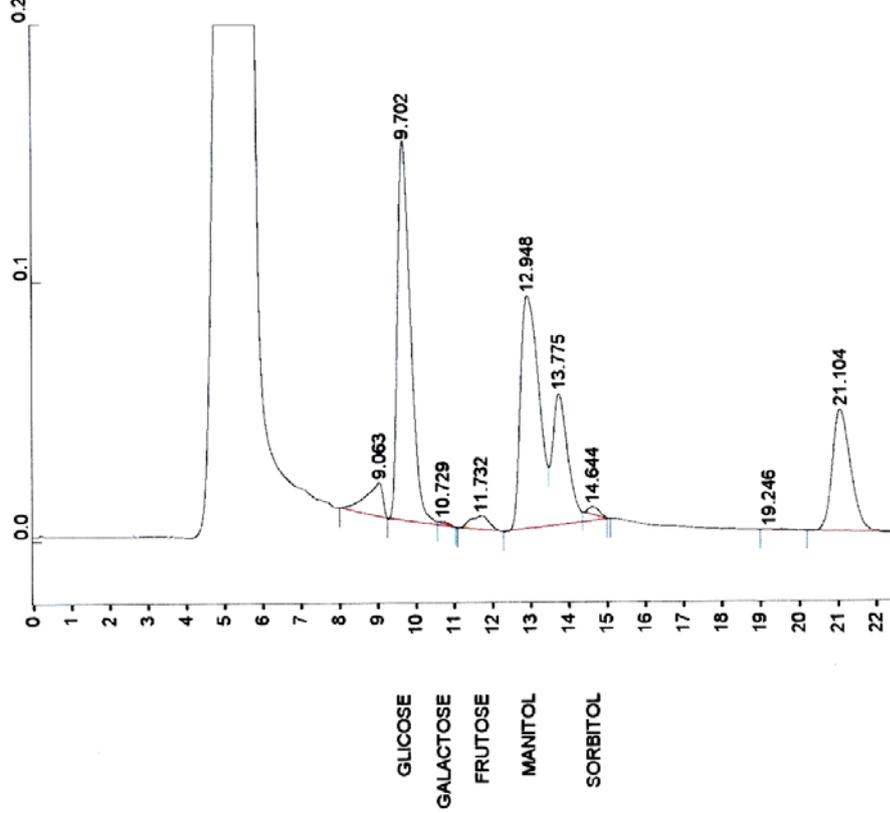
ANEXO 21 - Cromatograma do Recém-nascido 15.



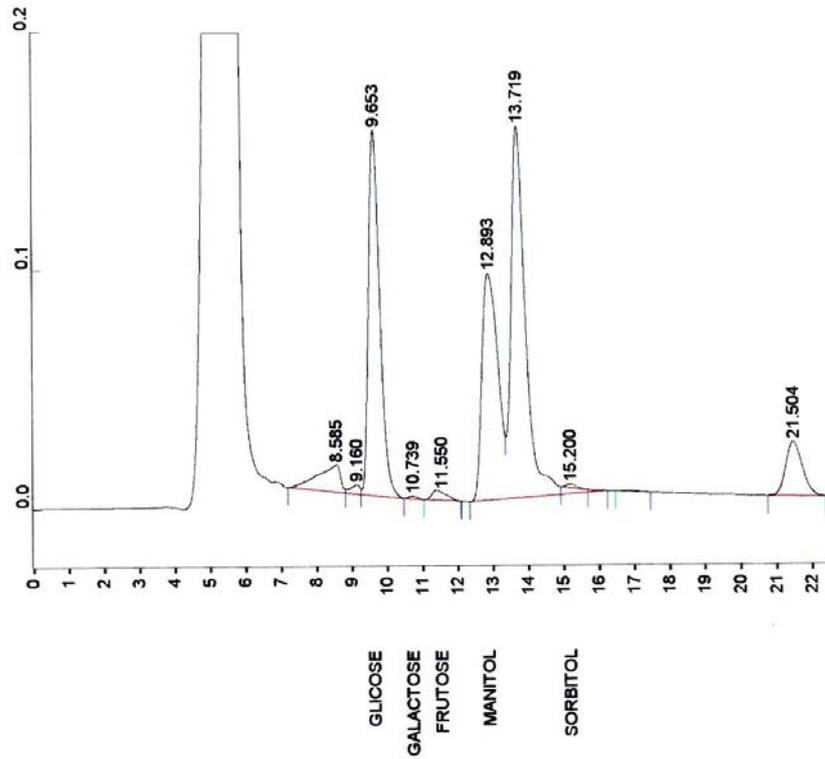
ANEXO 22 - Cromatograma do Recém-nascido 16.



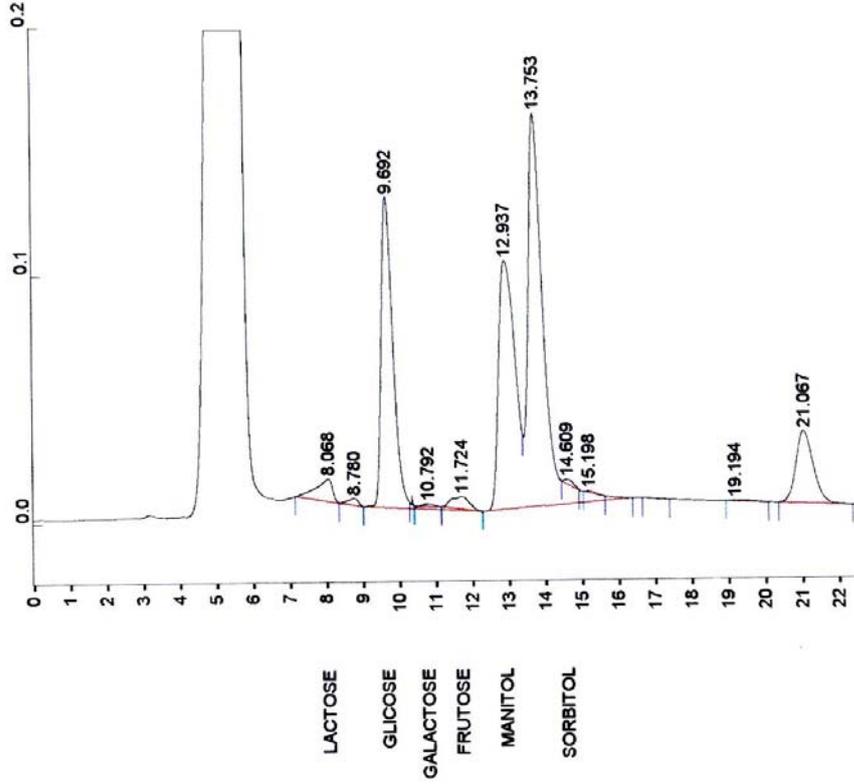
ANEXO 23 - Cromatograma do Recém-nascido 17.



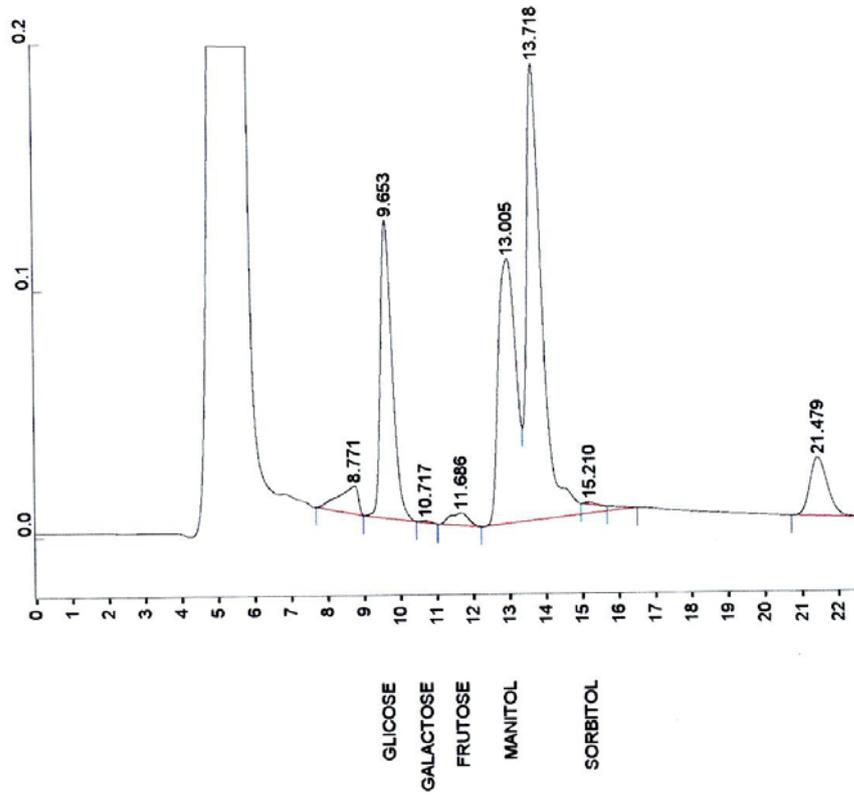
ANEXO 24 - Cromatograma do Recém-nascido 18.



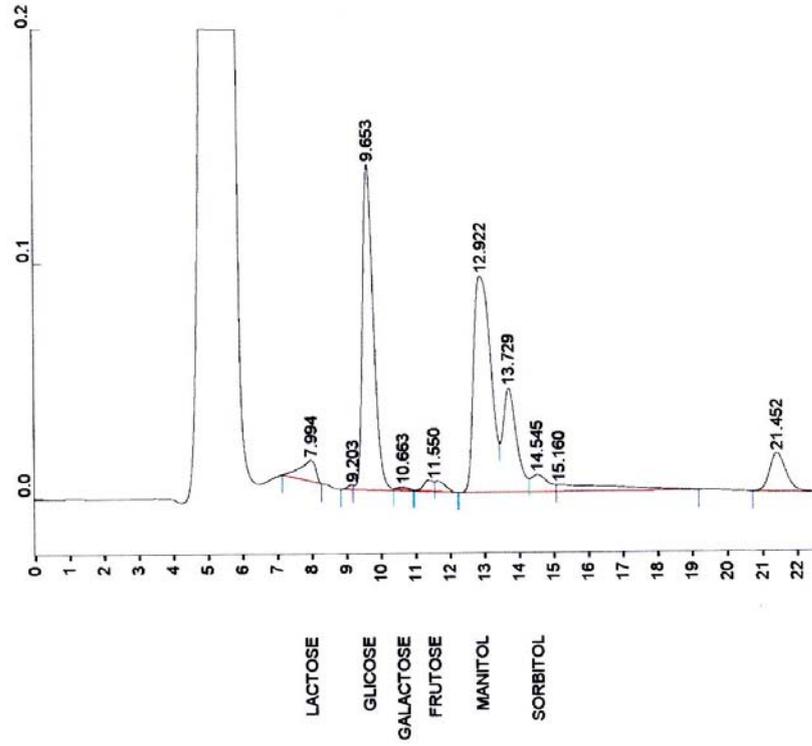
ANEXO 25 - Cromatograma do Recém-nascido 19.



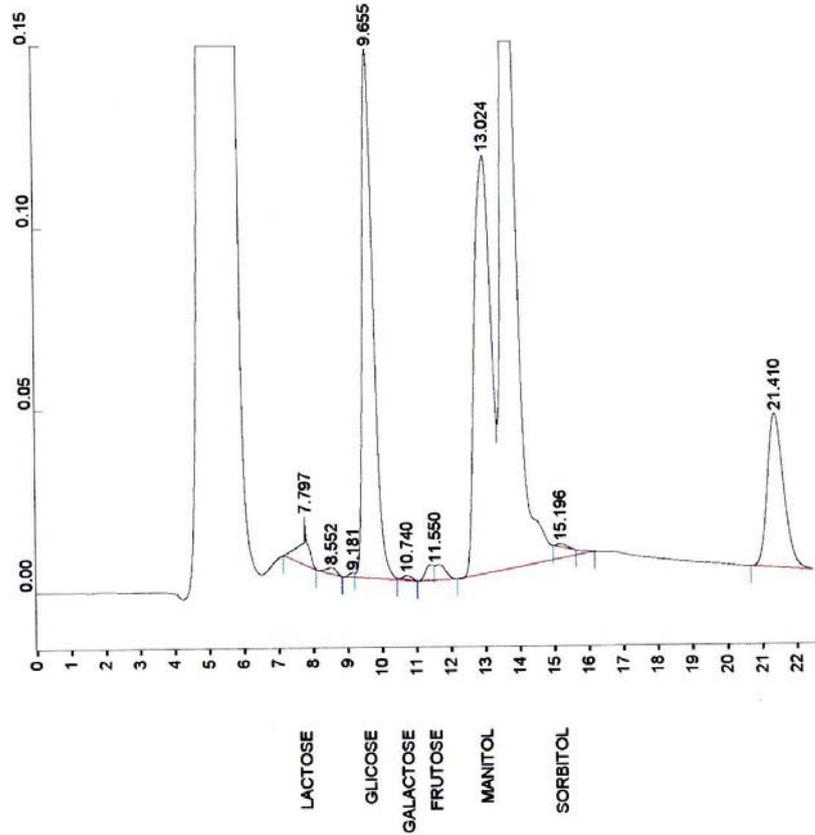
ANEXO 26 - Cromatograma do Recém-nascido 20.

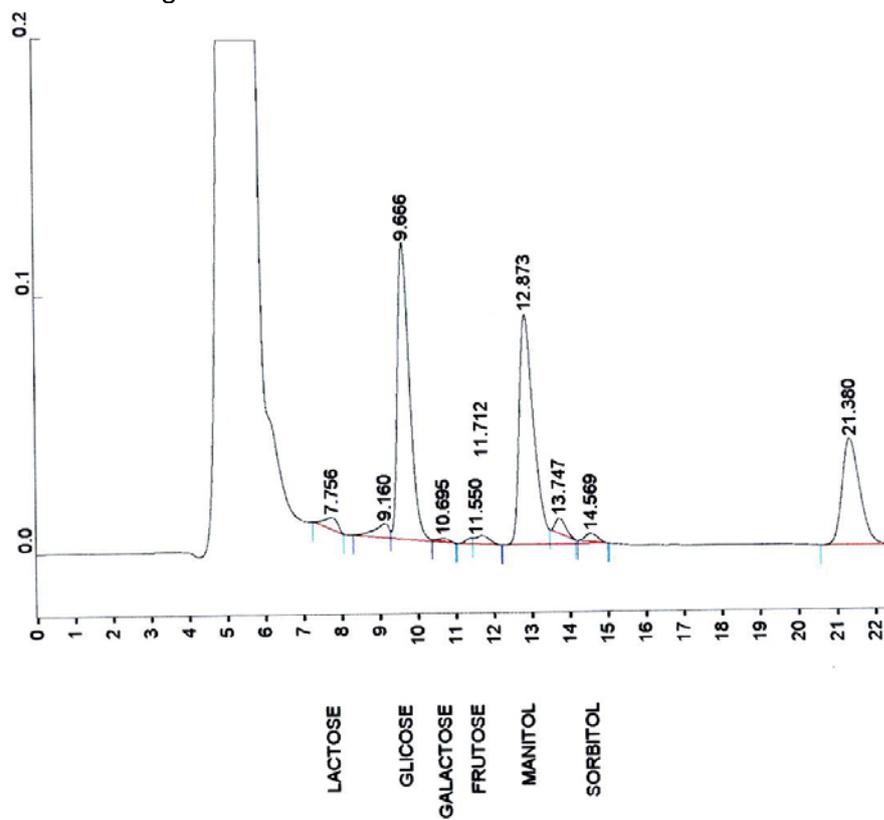
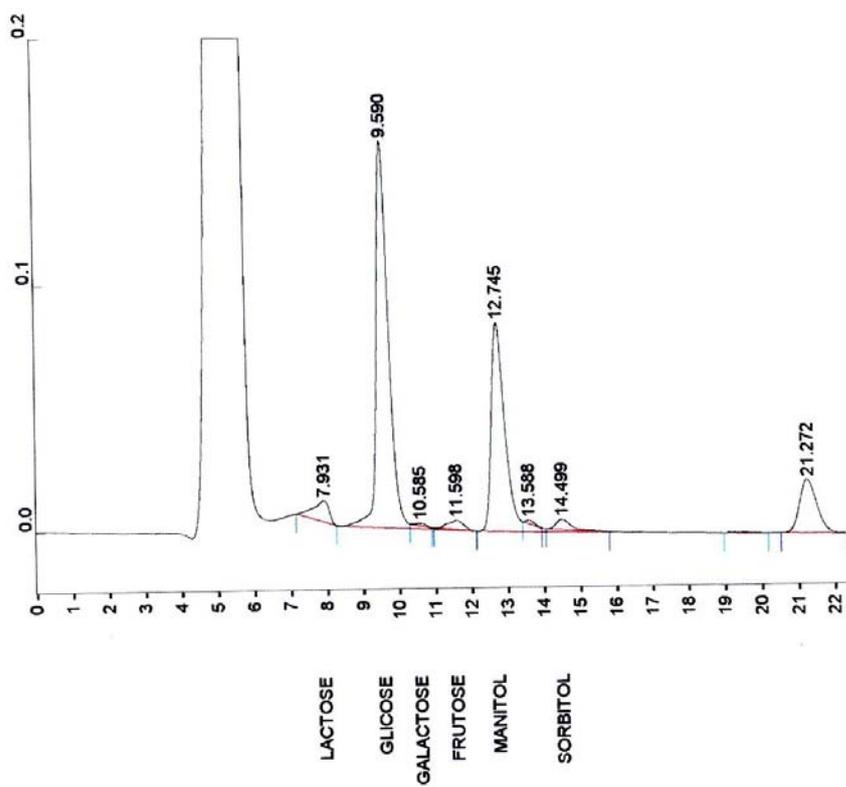


ANEXO 27 - Cromatograma do Recém-nascido 21.

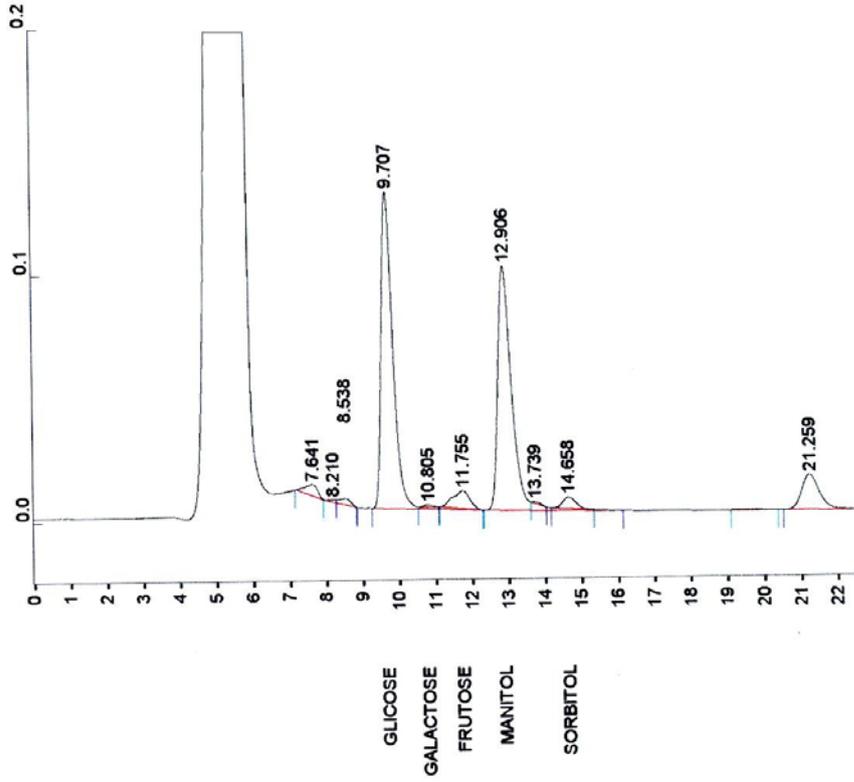


ANEXO 28 - Cromatograma do Recém-nascido 22.

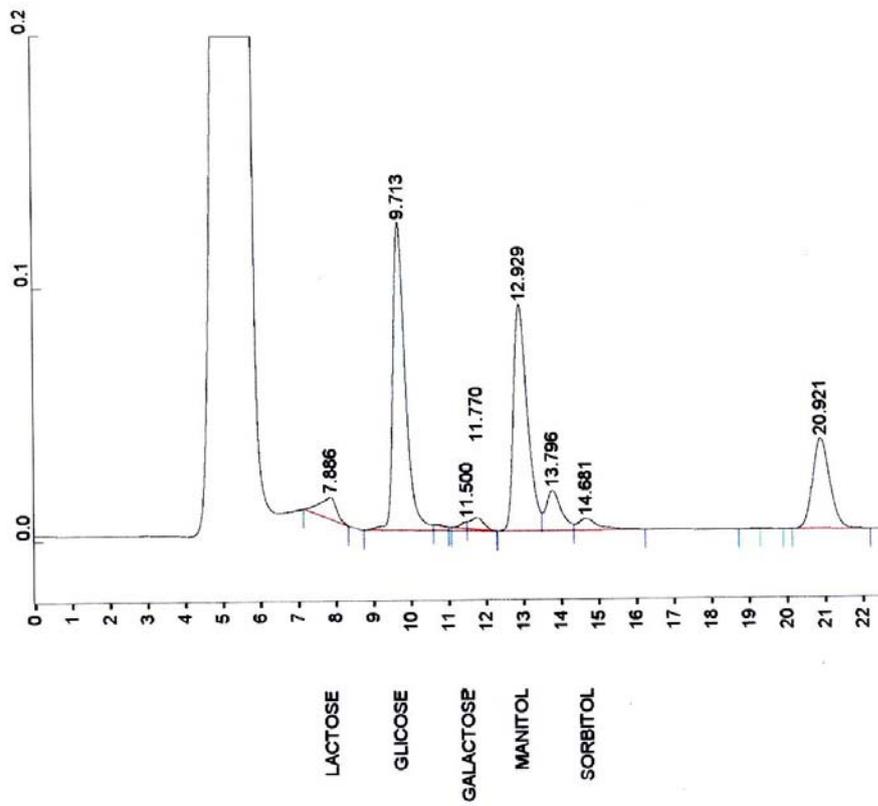


ANEXO 29 - Cromatograma do Recém-nascido 23.**ANEXO 30 - Cromatograma do Recém-nascido 24.**

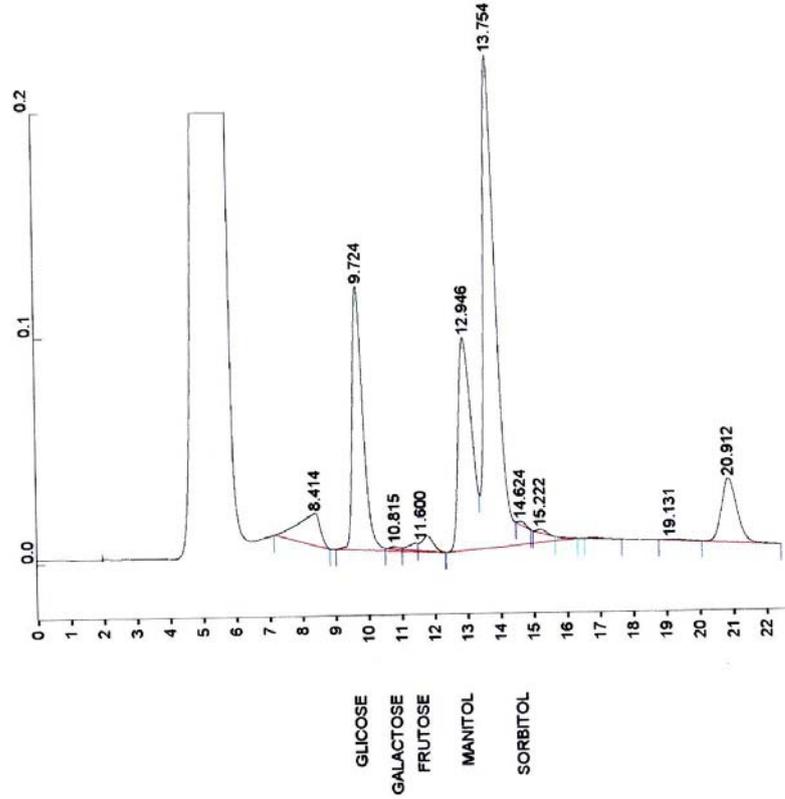
ANEXO 31 - Cromatograma do Recém-nascido 25.



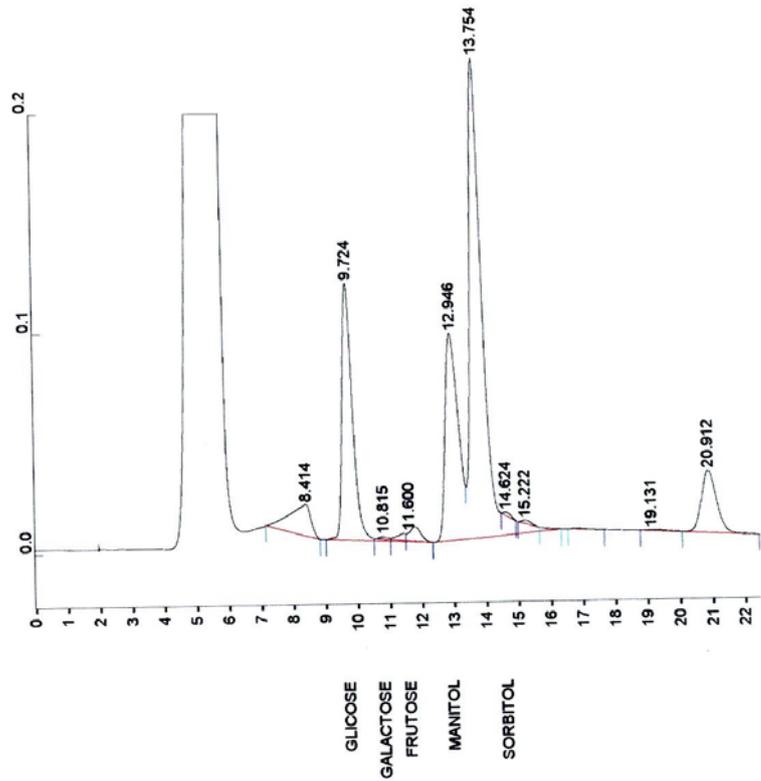
ANEXO 32 - Cromatograma do Recém-nascido 26.



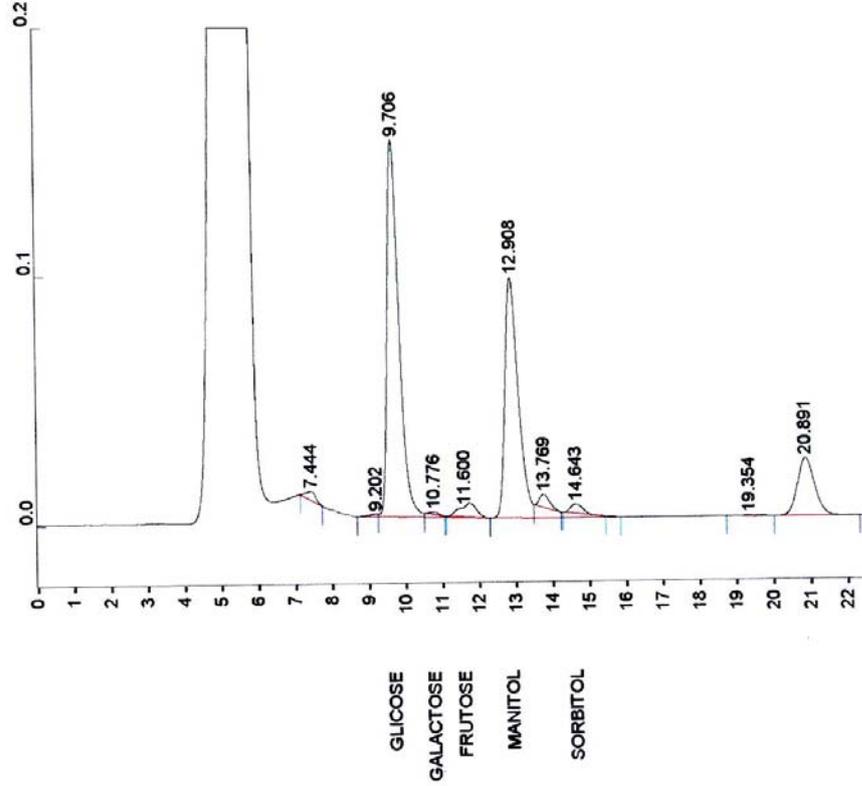
ANEXO 33 - Cromatograma do Recém-nascido 27.



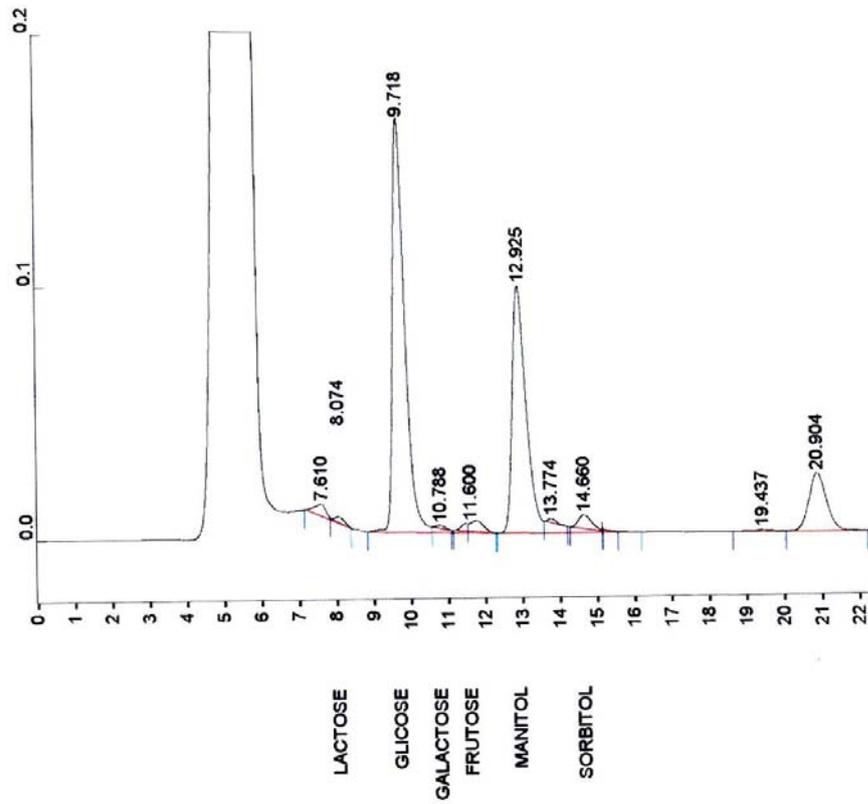
ANEXO 34 - Cromatograma do Recém-nascido 28.



ANEXO 35 - Cromatograma do Recém-nascido 29.



ANEXO 36 - Cromatograma do Recém-nascido 30.



ANEXO 37 - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA**

Botucatu, 06 de abril de 1.998

OF. 063/98-CEP
MVCR/asc.

Prezado Senhor,

O Projeto de pesquisa intitulado "*Avaliação bioquímica da frutose, glicose, frutose-6, fosfato e frutose- 1,6, di-fosfato no sangue do binômio materno fetal e no recém-nascido*", recebeu do relator parecer *favorável*, , aprovado em reunião do CEP de 06 de abril de 1.998.

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.


Profª Drª Marilza Vieira Cunha Rudge
Presidente do CEP

Ilustríssimo Senhor
Dr. Rodrigo Crespo Barreiros
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina de Botucatu

ANEXO 38 – Pesquisa sobre carboidratos em recém-nascidos

O presente trabalho é resultado de uma pesquisa conjunta realizada pelo autor e pela Dra Grasiela Bossolan, sob orientação da Profa. Dra. Cleide Petean Trindade.

O autor e a Dra. Grasiela coletaram as amostras em conjunto, utilizando o mesmo material e o mesmo grupo de recém-nascidos.

A cromatografia líquida de alta resolução foi utilizada para a dosagem de carboidratos, sendo que, no trabalho de pesquisa apresentado pela Dra. Grasiela Bossolan, a galactose e a glicose foram estudadas. Neste trabalho, a frutose, o sorbitol e a glicose foram estudados.

O trabalho em relação à galactose fez parte da Dissertação apresentada pela Dra. Grasiela em dezembro de 2000, ao Programa de Pós-Graduação em Pediatria, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.