

## Parâmetros físico-químicos de qualidade de peixe salgado e seco (bacalhau) comercializado em mercados varejistas

Physical-chemical quality parameters of salted and dried fish (codfish) traded by retail markets

RIALA6/1237

Eliane Teixeira MÁRSICO<sup>1</sup>, Carla da SILVA<sup>1\*</sup>, Viviane Brandão BARREIRA<sup>1</sup>, Samira Pirola Santos MANTILLA<sup>1</sup>, Ismar Araujo de MORAES<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: Rua Vital Brasil Filho, 64, 24230-340, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

e-mail: carlavet.s@gmail.com

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói-RJ.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói-RJ.

Recebido: 04.05.2009 – Aceito para publicação: 04.10.2009

### RESUMO

Foram avaliados os parâmetros físico-químicos de qualidade em amostras de peixe salgado e seco (bacalhau) comercializado no mercado varejista da Cidade do Rio de Janeiro/RJ. Das 20 amostras analisadas, 75% apresentaram valores de umidade acima do limite máximo permitido pela legislação. Os valores de Aa variaram entre 0,70 e 0,84. A faixa predominante do pH foi de 5,7 a 6,0 e apenas uma amostra se destacou das demais por apresentar pH 7,1. Os valores de Bases Voláteis Totais (BVT) variaram de 1,76 a 10,58mg N/100g. A quantidade de resíduo mineral fixo total foi maior do que o limite estabelecido em 25% das amostras analisadas. Em todas as amostras analisadas, o índice de cloretos foi superior ao valor mínimo estabelecido. Em 14 das 20 amostras coletadas, foi realizada a determinação do ranço oxidativo, e quatro apresentaram resultados positivos. Observou-se a ocorrência de fraude, pela adição de sulfito de sódio em uma amostra e pela presença de histamina em quantidade de 2 a 5 mg/100g em uma outra amostra. De modo geral, a qualidade do bacalhau disponível ao consumo apresentou-se insatisfatória, em função do percentual de amostras que mostraram não conformidade com os padrões oficiais para alguns parâmetros e pela presença de ranço, sulfito e histamina, que além de sugerirem perda de qualidade do produto, esses podem comprometer a saúde do consumidor.

**Palavras chave.** bacalhau, qualidade, controle físico-químico.

### ABSTRACT

Physical-chemical quality parameters in samples of salted and dried fish (codfish) traded in retail markets at the city of Rio de Janeiro/RJ was evaluated. Of 20 analyzed samples, 75% showed the humidity rates above the maximum limit permitted by legislation. The rates of Aa varied from 0.70 to 0.84, and the pH value was predominantly on average from 5.7 to 6.0, and only one sample had pH 7.1. The total volatile bases (TVB) values varied from 1.76 to 10.58mg N/100g, and the total quantity of fixed mineral residue exceeded the limit in 25% of analyzed samples. All of analyzed samples had chloride contents higher than that established minimum limit. In 14 out 20 collected samples, the oxidative rancidity was determined, and four samples showed positive result. =

**Key words.** codfish, quality, physical-chemical control.

## INTRODUÇÃO

O pescado é um alimento de excelente valor nutricional, com proteínas de alto valor biológico e lipídios insaturados, além de vitaminas e sais minerais que complementam uma dieta saudável. O bacalhau é um peixe comercializado salgado e seco, consumido por grande parte da população. Entretanto, vários fatores podem influenciar a qualidade desse produto, tais como: obtenção da matéria-prima, transporte, desembarque, processamento, armazenamento e o modo de exposição na área de vendas.

A elevada atividade de água (Aa), a composição química, o teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, o ponto de hidrogênio iônico (pH) próximo da neutralidade, tornam o pescado um dos alimentos mais suscetíveis à deterioração<sup>1</sup>.

A realização da salga em peixes é um antigo e tradicional método de conservação<sup>2</sup>. O objetivo dessa operação é diminuir a Aa do produto para aumentar sua estabilidade microbiana, química, bioquímica e também contribuir para o desenvolvimento de características desejáveis de aroma e sabor nos produtos<sup>3</sup>. Produtos com altos teores de sal, como o pescado salgado e seco, são considerados de fácil conservação, apesar de não estarem livres de sofrer deterioração<sup>4</sup>, decorrente de ação enzimática e/ou bacteriana, resultando na produção de vários compostos nitrogenados, cujo conjunto é denominado bases voláteis totais (BVT), sendo que a sua quantificação é considerada um parâmetro de frescor<sup>5</sup>.

Outro importante parâmetro de qualidade para este tipo de alimento é o teor de resíduos minerais fixos (cinzas), que expressam o conteúdo de sais minerais presente no pescado. No entanto, nesse tipo de alimento, o percentual de cinzas será influenciado pela quantidade de cloreto de sódio adicionada durante o seu processamento tecnológico.

O bacalhau quando dessalgado contém em média 1,3% de gordura sendo a distribuição de ácidos graxos saturados, equivalente a de ácidos graxos insaturados<sup>6</sup>. A fração de ácidos graxos insaturados está altamente propensa a rancidez oxidativa<sup>7</sup>. E esta pode significar a ingestão de substâncias potencialmente tóxicas que contribuem para a ocorrência de processos como arteriosclerose e o câncer<sup>8</sup>.

O uso de conservantes e outros aditivos alimentares em diferentes países é limitado por legislações específicas, em função do efeito tóxico de muitas dessas substâncias.

A legislação brasileira estabelece que o uso de aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado<sup>9</sup>.

Mais um aspecto relevante a ser ressaltado é que, na deterioração dos peixes são formadas aminas biogênicas através da descarboxilação de aminoácidos por enzimas bacterianas e, dentre essas, destaca-se a histamina pelo potencial alergênico, mas que tem seu efeito potencializado pela presença de outras aminas como a putrescina e a cadaverina, provenientes da descarboxilação da lisina e da arginina<sup>10,11,12,13</sup>.

Sendo assim, neste trabalho objetivou-se avaliar através de parâmetros físico-químicos, a qualidade do peixe salgado seco (bacalhau) comercializado na Cidade do Rio de Janeiro, propondo-se sugerir através dos resultados, possíveis falhas no processamento tecnológico deste produto e/ou no controle de qualidade do mercado varejista, onde o mesmo é exposto à venda.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 20 amostras de bacalhau (*Gadus morhua*) salgado seco, coletadas em estabelecimentos varejistas localizados na Cidade do Rio de Janeiro por ação da Vigilância Sanitária Municipal (VISA-RJ), durante o período de agosto a dezembro de 2007. Após a obtenção, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Controle Físico-Químico de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, para a realização dos procedimentos analíticos.

Segundo métodos analíticos oficiais descritos pelo Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA)<sup>14</sup>, foram realizadas análises físico-químicas de umidade, pH, cinzas, cloretos e BVT. Para a realização das análises de BVT, as amostras foram dessalgadas, de acordo com a metodologia preconizada pela cartilha orientativa sobre pescado salgado e pescado salgado seco da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>15</sup>. Ainda seguindo a referência analítica do LANARA, foi realizada a prova de "Kreiss" para a determinação do ranço oxidativo, mas esta foi realizada em 14 das 20 amostras devido à insuficiente quantidade de gordura obtida em 6 das 20 amostras. A atividade de água (Aa) foi determinada utilizando o aparelho "Pawkit®" (Decagon Devices, Inc., USA). A determinação de sulfito de sódio foi realizada segundo o Instituto Adolfo Lutz<sup>16</sup> e o teor de histamina

pelo método de Cromatografia em Camada Delgada, proposto por Schutz, Chang e Bjeldanes<sup>17</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de umidade, Aa, pH, BVT, cinzas e cloretos das amostras de bacalhau salgado e seco, assim como, desvio padrão, valores mínimos e máximos obtidos, os valores legais de referência e os percentuais de amostras fora do padrão legal vigente, podem ser observados na Tabela 1.

Verificou-se que, entre as 20 amostras analisadas, 15 (75%) apresentaram valores de umidade acima de 45%, que é valor máximo estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco<sup>18</sup>, para espécies de pescados consideradas magras, categoria na qual está inserido o bacalhau. Em trabalho realizado por Souza et al.<sup>19</sup>, 100% das 15 amostras de bacalhau analisadas encontravam-se com a umidade acima do valor especificado pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)<sup>20</sup>, que estabelece como limite máximo 35% de umidade. Neste mesmo estudo, foi encontrado valor de umidade média em torno de 46,3%, sendo esse valor menor do que o valor médio encontrado nas amostras analisadas no presente trabalho, que foi de 47,21%.

Com relação ao armazenamento e a exposição em estabelecimentos comerciais, a umidade relativa do ambiente interferirá na absorção de água pelo bacalhau. Sendo assim, cuidados devem ser tomados no intuito de evitar o aumento da umidade e também da Aa neste produto, pois em alimentos com maiores teores de água a proliferação de micro-organismos, dentre eles os patogênicos, ocorre mais facilmente<sup>1</sup>.

Os valores de Aa das amostras de bacalhau variaram entre 0,70 e 0,84. Não há um padrão proposto pela legislação para este parâmetro neste produto. Falhas no processo de salga ou até mesmo no armazenamento e exposição do bacalhau nos estabelecimentos comerciais, podem interferir no aumento da umidade e da Aa. O efeito osmótico decorrente da salga é representado pela penetração do sal e saída da água livre existente na carne do pescado. Falhas neste processo respondem pelo aumento dos teores de umidade e Aa do bacalhau.

Com relação ao pH das amostras analisadas, a faixa predominante em 15 amostras (75 %) foi de 5,7 a 6,0. Nesta faixa de pH estão classificados os alimentos de baixa acidez, os quais requerem cuidados especiais de armazenamento devido à possibilidade de crescimento de bactérias patogênicas<sup>1</sup>. Uma amostra se destacou das demais por apresentar pH de 7,1, sugerindo possível degradação de aminoácidos e da ureia, a desaminação da creatina do pescado, ou ainda, fraude por adição de

**Tabela 1.** Resultados das análises de umidade, Aa, pH, BVT, cinzas e cloretos realizadas nas amostras de bacalhau

Análises	Resultados				Valores Legais de Referência	%Fora do Padrão Legal
	Valor Médio	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo		
Umidade (%)	47,21%	±5,16	32,11%	56,73%	45% <sup>a</sup>	75%
Aa	0,73	±0,02	0,70	0,84	---	---
pH	6,0	±0,31	5,7	7,1	---	---
*BVT (mg N/100g)	3,17	±2,10	1,76	10,58	30 mg N/100g <sup>b</sup>	Nenhuma
Cinzas (%)	23,26%	±3,23	17,22%	31,21%	25% <sup>c</sup>	25%
Cloretos (%)	19,43%	±2,87	14,67%	25,53%	10% <sup>a</sup>	Nenhuma

<sup>a</sup> Portaria N° 52 de 2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>18</sup>

<sup>b</sup> Portaria N° 185 de 1997 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>22</sup>

<sup>c</sup> Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)<sup>20</sup>

--- Não há padrão estabelecido pela legislação atual para pescado salgado seco.

\* Esta análise foi realizada com as amostras dessalgadas e os valores obtidos foram comparados com os valores legais vigentes para peço fresco.

polifosfato, que neste estudo não foi objeto de avaliação. Os resultados obtidos para pH se apresentaram, em média, inferiores aos encontrados por Lauritzsen et al.<sup>21</sup>. Segundo estes autores, em peixes como o *Gadus morhua*, o pH pode variar de 6,8 a 6,9 em um a dois dias após sua morte, sendo que no bacalhau após 28 dias de cura pelo sal, o pH pode declinar para 6,2.

Como relatado anteriormente, as análises BVT foram realizadas nas amostras de bacalhau após a completa retirada do sal. O objetivo da dessalga foi o de poder comparar os valores obtidos nesta análise com os propostos pela legislação, que são instituídos para peixes frescos, visto que, se bem conservado pelo sal, após dessalgado o peixe deve conter os mesmos valores de BVT que possuía antes da realização da salga, que por sua vez, deve ter sido realizada com o peixe ainda fresco. Os resultados de BVT obtidos nas amostras dessalgadas, variaram de 1,76 a 10,58mg N/100g. Estes valores estão abaixo do limite máximo de 30mg N/100g, estipulado para peixes frescos e não elasmobrânquios, pela Portaria N° 185 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>22</sup>.

Com relação aos valores de resíduo mineral fixo, cinco amostras (25%), excederam o limite máximo de 25% estabelecido pelo RIISPOA<sup>20</sup> e, o teor de cloreto de sódio, estava acima do limite mínimo estabelecido pela legislação brasileira para pescado salgado e seco<sup>18</sup>, que é de 10%, em todas as amostras analisadas. O teor de sal observado variou entre 14,67 e 25,53% (média=19,43%), sugerindo não haver problemas tecnológicos com relação a este parâmetro. Porém, vale ressaltar que a quantidade de sal presente na amostra influencia no teor de resíduo mineral fixo, e os valores bem acima do limite mínimo, podem ter contribuído para o excesso de resíduo mineral fixo detectado em algumas amostras.

Os peixes são boas fontes de ácidos graxos poli-insaturados, e quando esses alimentos são processados e armazenados, como é caso do pescado salgado seco, ficam mais propensos à oxidação<sup>23</sup>. Nesta pesquisa a presença de ranço oxidativo ocorreu em quatro das 14 amostras analisadas. A velocidade de oxidação depende de diversos fatores como: grau de saturação dos ácidos graxos, temperatura, umidade e a presença de outras substâncias que favoreçam reações de oxidação<sup>7</sup>. A salga não evita a degradação química, pelo contrário, o sal acelera a oxidação lipídica por se tratar de um elemento pró-oxidante da gordura. Dessa forma quanto mais gordo e salgado for o bacalhau, mais propenso estará à rancidez<sup>1</sup>.

Deve-se ressaltar que essa alteração é um fator de risco à saúde do consumidor, visto que os peróxidos e muitos de seus produtos de degradação apresentam propriedades citotóxicas<sup>8</sup>.

Das 20 amostras analisadas em uma constatou-se adição de sulfito de sódio, sendo caracterizada ação fraudulenta. Este fato é bastante preocupante, pois este aditivo possui efeitos tóxicos quando ingerido. A legislação brasileira não permite o uso de sulfito de sódio como conservante em pescado, com exceção de camarões e lagosta logo após a captura para prevenir o escurecimento enzimático<sup>24</sup>. Segundo Ring et al.<sup>25</sup>, as reações alérgicas por alimentos representam um problema atual e crescente na medicina clínica. Os sintomas de alergias originárias dos alimentos incluem: reações de pele, respiratória, gastrointestinais e sintomas cardiovasculares, tendo como a manifestação mais relevante o choque anafilático.

Uma das amostras apresentou teor de histamina entre 2 a 5 mg/100g. Apesar de não ser uma análise de rotina nesse produto, a presença de aminas biogênicas sugere degradação de aminoácidos, portanto perda de qualidade. A presença de histamina em produtos salgados pode ocorrer, pois bactérias como a *Morganella morganii*, são capazes de se desenvolver mesmo em alimentos com alto teor de sal, e por ação de suas enzimas ocorre a descarboxilação do aminoácido histidina com a formação de histamina<sup>26</sup>. O perigo da histamina em pescado é intensificado pela sua característica de não volatilidade e resistência ao tratamento térmico, além disto, ela pode conferir toxicidade ao produto mesmo antes deste ser considerado deteriorado ou sensorialmente inaceitável<sup>9</sup>. Inúmeras reações adversas têm sido atribuídas às aminas biogênicas provenientes da dieta. Vários sintomas foram alegados em função da ingestão de histamina, dentre eles, urticária, dores de cabeça, diminuição da pressão sanguínea, rubor, espirros e angústia respiratória e gastrointestinal<sup>27</sup>.

## CONCLUSÃO

O teor de umidade acima do máximo permitido e os valores de resíduo mineral fixo acima do padrão oficial caracterizam perda de qualidade do bacalhau. A presença de ranço oxidativo também interfere na qualidade e está relacionada com risco à saúde do consumidor, assim como a presença de sulfito de sódio e de histamina. O sulfito, além de possuir efeitos tóxicos, também caracteriza fraude

no comércio deste produto. A detecção de histamina e de ranço oxidativo, juntamente com os outros resultados obtidos e citados acima, demonstram que é necessário um maior controle na qualidade do bacalhau salgado e seco comercializado em mercados varejistas da Cidade do Rio de Janeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Franco DBGM, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. 2nd ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1996.
2. Thorarinsdottir KA, Arason S, Geirsdottir M, Bogason SG, Kristbergsson K. Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry. *Food Chem* 2002; 77: 377-85.
3. Chiralt A, Fito P, Barat JM. Use of vacuum impregnation in food salting process. *J. Food Eng* 2001; 49: 141-51.
4. Aiura FS, Carvalho MRB, Viegas EMM, Kirschnik PG, Lima TMA. Conservação de filés de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em salga seca e salga úmida. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2008; 60 (6): 1531-7.
5. Pereira WD, Athayde AH, Pinto KP. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió-AL. *Rev Hig Alim* 2001; 15 (84): 67-74.
6. TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. [acesso em 08 de jul. 2008] Available: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela&PHPSESSID=4a4ec0be7817bae5eeb9263a112ba1e5>.
7. Bressan MC, Perez JRO. *Tecnologia de Carnes e Pescados*. Lavras:UFLA; 2001.
8. Kraemer FB. Análise Micológica e determinação físico-química de amostras de camarão salgado-seco comercializados no Estado do Rio de Janeiro [Dissertação de mestrado]. Niterói, Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense 2000. 79p.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Portaria nº 540 de de outubro de 1997 da do. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 out. 1997.
10. Bover-Cid S, Izquierdo-Pulidom, Vidal-Carou MC. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science* 1999; 51:305 - 11.
11. Soares VF M, Vale SR, Junqueira RG, Glória M A. Teores de Histamina e Qualidade Físico-Química e Sensorial de Filé de Peixe Congelado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1998; 18 (4): 462-70.
12. Moreno RB. Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo [Dissertação de mestrado]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 66p.
13. Judite LG. Aminoácidos biogênicos, aminoácidos voláteis, triptofano livre e ureia como índices químicos de qualidade e frescor de pescado [Tese de doutorado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 125p.
14. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Portaria nº 001 de 7 de outubro de 1981. Aprova os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II. Métodos físicos e químicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1981.
15. Cartilha orientativa sobre comercialização de pescado salgado e pescado salgado seco. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2007). Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/cartilha\\_bacalhau.pdf](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/cartilha_bacalhau.pdf)> Acesso em 08 jan. 2008.
16. Instituto Adolfo Lutz (IAL). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Ed. São Paulo-SP, 1985.
17. Schutz DE, Chang GW, Bjeldanes L F. Rapid thin layer chromatographic method for the detection of histamine in fish products. *Journal of the AOAC* 1976; 59 (6): 1224-1225.
18. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 52. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 29 dez. 2000.
19. Souza VG, Mano SB, Pardi HS. Avaliação comparativa de metodologias para determinação de umidade em produtos salgados secos (charque e bacalhau). *Rev Hig Alim* 2000; 14 (78/79): 55-8.
20. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos nº 1255 de 25 de junho de 1962, 1236 de 02 de setembro de 1994, 1812 de 08 de fevereiro de 1996 e 2244 de 04 de junho de 1997 da do. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1997.
21. Lauritzsen K, Akse L, Johansen A, Joensen S, Sorensen NK, Olsen RL. Physical and quality attributes of salted cod (*Gadus morhua* L.) as affected by the state of rigor and freezing prior to salting. *Food Research International* 2004; 37 (4): 677-88.
22. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº185 de 1997 Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e viscerado). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 mai. 1997.
23. Sampaio GS. Ocorrência de óxido de colesterol e análise do perfil lipídico em camarão salgado-seco [Dissertação mestrado]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo 2004. 105p.
24. Brasil. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução nº 4 1988 da do. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto n. 55.871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 nov. 1988.
25. Ring J, Brockow K, Behrendt H. Adverse reactions to foods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2001; 756: 3-10.
26. Huss HH. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Roma: FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations); 1997.
27. Jansen SC, Van Dusseldorp M, Bottema KC, Dubois AEJ. Intolerance to dietary biogenic amines: a review. *Ann. Allergy. Asthma. & Immunology* 2003; 91: 233-41.