

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Bruna Amatto Duarte Pires

**ANÁLISE QUALITATIVA DE GLÚTEN EM ALIMENTOS: MÉTODOS
IMUNOQUÍMICOS E MOLECULARES**

Rio de Janeiro
2013

Bruna Amatto Duarte Pires

**ANÁLISE QUALITATIVA DE GLÚTEN EM ALIMENTOS: MÉTODOS
IMUNOQUÍMICOS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientador: Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro
2013

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Pires, Bruna Amatto Duarte

Análise qualitativa de glúten em alimentos: métodos imunoquímicos e moleculares /
Bruna Amatto Duarte Pires. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

82 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Curso de Especialização em Controle da
Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados a Vigilância Sanitária, Instituto
Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2013.

Orientador: Victor Augustus Marin

1. Glúten. 2. Análise Qualitativa. 3. Composição de Alimentos. 4. Imunoquímica. I.
Título.

Bruna Amatto Duarte Pires

**ANÁLISE QUALITATIVA DE GLÚTEN EM ALIMENTOS: MÉTODOS
IMUNOQUÍMICOS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Kátia Christina Leandro (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Christina Maria Queiroz de Jesus Morais (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Rinaldini Coralini Philippo Tancredi (Doutora)
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Dedico este trabalho a memória do
meu avô José Amatto

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela dádiva da vida e por estar sempre ao meu lado nas dificuldades, angústias, conquistas e felicidades;

Com imenso carinho, aos meus PAIS, meus exemplos de seres humanos, pela ajuda nas dificuldades, pelos conselhos diante das indecisões, pelas comemorações frente a cada vitória e acima de tudo, pelo eterno amor;

A minha irmã, Luana, pela amizade, amor, cumplicidade, pelos conselhos e por estar sempre presente em todos os momentos;

Ao meu noivo, Leonardo, pelo amor em todos os momentos, pela dedicação, pela paciência nos meus momentos de desespero, pela espera nos momentos da minha ausência, pelo apoio, incentivo, companheirismo durante esses anos. E principalmente por sempre me apresentar pontos de vista diferentes para as questões da vida. Te amo.

Ao Professor Dr. Victor Augustus Marin, pela orientação deste estudo, pelo convívio nestes anos, mostrando sempre disposição, dedicação e compreensão;

A grande amiga Myrna, por estar sempre disposta a me ajudar, encorajar e incentivar, pelas idas ao laboratório para me auxiliar, pelos tantos trabalhos meus que leu, releu e corrigiu, pelas angústias divididas, pelos trabalhos e momentos de estudo, os almoços, as conversas, pela torcida e por me fazer acreditar sempre que tudo daria certo. Certamente o maior presente que levo daqui.

A querida Dra. Christina Maria Q. J. Moraes, pela contribuição inestimável no ensaio do ELISA, por me ceder o espaço em seu laboratório, por todo tempo dispensado a mim, dedicação e empenho em todas as etapas deste trabalho;

A querida técnica Ms. Renata Trotta do laboratório de Biologia Molecular, pela infinita paciência, colaboração, amizade e ensinamentos;

A Dra. Paola Cardarelli, por estar sempre disposta a ouvir todas as minhas dúvidas e inquietações: minhas famosas sessões de terapia. Obrigada pelos conselhos, infinitos ensinamentos, amizade e paciência durante esses dois anos;

A Dra. Regina Branquinho, por me ceder sempre o espaço de seu laboratório, por todo material emprestado e por todas as vezes que recorri a ela para sanar minhas dúvidas;

A bolsista de iniciação científica Maria Luiza Cabral, pela amizade e companhia.

A coordenação da Pós Graduação pela oportunidade e ajuda financeira. Aos demais membros docentes, a todo time da secretaria pela paciência e colaboração. E um agradecimento especial a coordenadora Kátia Christina Leandro, pela amizade e confiança.

À FAPERJ pelo apoio financeiro;

E a todos meus amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.

Dalai Lama

RESUMO

O glúten é a fração protéica do trigo, cevada, centeio e aveia, a que algumas pessoas são intolerantes. Tal intolerância é conhecida como Doença Celíaca e é caracterizada por atrofia total ou subtotal das vilosidades do intestino delgado proximal e conseqüentemente, levando à má absorção da grande maioria dos nutrientes em indivíduos geneticamente susceptíveis. O tratamento consiste em dieta isenta de glúten com supressão total e permanente da ingestão desses cereais e seus derivados. O objetivo do estudo foi avaliar a presença de glúten em biscoitos comercializados em estabelecimentos comerciais do município do Rio de Janeiro utilizando duas técnicas: ELISA R5 e PCR; e comparar os resultados encontrados por meio destes métodos com as informações contidas nos rótulos desses alimentos, a fim de verificar a veracidade da rotulagem. Através da técnica de PCR observou-se que das quinze amostras que possuíam a inscrição “não contém glúten” no rótulo, todas foram positivas para o cereal trigo e que dos quinze biscoitos aqui estudados, todos amplificaram para pelo menos um dos cereais, fato que demonstra uma possível contaminação no processamento de todas as amostras avaliadas com algum dos cereais. Já as amostras rotuladas como “contém glúten”, as quinze foram positivas para os cereais trigo e cevada. Para o cereal centeio, apenas uma amostra obteve resultado negativo e para a aveia oito amostras obtiveram resultado positivo e sete negativos. Pela técnica ELISA, para biscoitos rotulados com a inscrição “não contém glúten”, apenas uma amostra (6,67%) obteve resultado distinto a descrição presente no rótulo. Em biscoitos rotulados com a inscrição “contém glúten”, todos obtiveram resultados positivo para a técnica ELISA. Sendo assim o estudo verificou que persiste a contaminação por glúten em alimentos destinados especificamente a população celíaca. Demonstrou ainda que a presença de glúten, principalmente em alimentos rotulados como isentos de glúten, pode ser avaliada através da técnica ELISA R5 e aponta ainda para a importância da utilização de técnicas de confirmação, como a PCR, para confirmar a contaminação e identificar quais foram os cereais contaminantes.

Palavras- chave: Glúten. ELISA R5. PCR

ABSTRACT

Gluten is the protein fraction of wheat, barley, rye and oats, some people are intolerant. Such intolerance is known as Celiac Disease and is characterized by total or subtotal atrophy of the villi of the proximal small intestine and consequently leading to bad absorption of most nutrients in genetically susceptible individuals. The treatment consists of a gluten-free diet with total and permanent suppression of ingestion of these cereals. The objective of the study was to evaluate the presence of gluten in snacks sold in commercial establishments in the city of Rio de Janeiro using two techniques: R5 ELISA and PCR, and compare the results using these methods with the information on the labels of these foods, to verify the accuracy of labeling. Through PCR, the fifteen samples that had the inscription "do not contains gluten" on the label, all were positive for wheat, and the fifteen snacks studied here all amplified to at least one of the cereals, which demonstrates a possible contamination in the processing of all samples with some cereals. The samples labeled "gluten-free", all the fifteen were positive for the cereals wheat and barley. For the cereal rye, only one sample had negative results and for oats eight samples had positive results and seven negative. By R5 ELISA for snacks labeled with the inscription "do not contains gluten", only one sample (6.67%) obtained a different result this description on the label. In snacks labeled with the inscription "gluten free", all showed positive results for the ELISA technique. Thus the study found that gluten contamination persists in foods intended specifically for celiac population. Further demonstrated that the presence of gluten, particularly in food labeled as "gluten free" can be evaluated using R5ELISA and still points to the importance of using techniques, such as PCR, to confirm infection and identify which were the contaminants cereals.

Keywords: Gluten. R5 ELISA. PCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	O grão de trigo e a sua constituição	16
Figura 2	Atrofia da mucosa intestinal.....	19
Figura 3	Caracterização dos 4 estágios de agressão da mucosa intestinal	19
Figura 4	Etapas do Método Elisa R5	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Toxicidade dos cereais na doença celíaca	17
Tabela 2	Resultado do PCR para a presença dos cereais: trigo, centeio, cevada e aveia em 15 amostras de biscoitos comercializados no município do Rio de Janeiro com a inscrição “não contém glúten”	43
Tabela 3	Resultado do PCR para a presença dos cereais: trigo, centeio, cevada e aveia em 15 amostras de biscoitos comercializados no município do Rio de Janeiro com a inscrição “contém glúten”	45
Tabela 4	Dados para elaboração da curva padrão de gliadina	46
Tabela 5	Resultado do ELISA R5 para a presença de glúten em 15 amostras de biscoitos comercializados no município do Rio de Janeiro com a inscrição “não contém glúten”	50
Tabela 6	Resultado do ELISA R5 para a presença de glúten em 15 amostras de biscoitos comercializados no município do Rio de Janeiro com a inscrição “contém glúten”.	51
Tabela 7	Comparação dos resultados encontrados com as técnicas ELISA R5 e PCR em 15 amostras de biscoitos com a inscrição “não contém glúten” e 15 amostras com a inscrição “contém glúten” comercializados no município do Rio de Janeiro.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Resultados positivos de amostras rotuladas com a inscrição “não contém glúten”, analisadas através da técnica PCR de acordo com o cereal.....	44
Gráfico 2	Resultados positivos de amostras rotuladas com a inscrição “contém glúten”, analisadas através da técnica PCR de acordo com o cereal.....	45
Gráfico 3	Curva Padrão de Gliadina 16/07/2012.	47
Gráfico 4	Curva Padrão de Gliadina 26/07/2012.	47
Gráfico 5	Curva Padrão de Gliadina 01/08/2012.	48
Gráfico 6	Curva Padrão de Gliadina 04/09/2012.	48
Gráfico 7	Resultados obtidos através do ELISA para biscoitos isentos ou não de glúten.	49

LISTA DE SIGLAS

- APPCC- Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle
- BPF - Boas Práticas de Fabricação
- CRE - Controle dos reativos da extração
- CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio
- DC - Doença celíaca
- DNA - Desoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
- EmA - Anti-endomísio
- ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- FAO – Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)
- G.G.P.F.P. - Glutamina- glutamina-prolina-fenilalanina-prolina
- IgA - Imunoglobulina A
- IgG - Imunoglobulina G
- OGM - Organismo geneticamente modificado
- POP - Procedimento Operacional Padronizado
- PCR – Polimerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
- RNA – Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
- TGt - Transglutaminase tecidual
- TGtA - Anti-Transglutaminase tecidual
- WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. AUTENTICIDADE ALIMENTAR	14
1.2. O GLÚTEN	15
1.3. A DOENÇA CELÍACA	17
1.3.1 Diagnóstico da Doença Celíaca	21
1.3.2 Tratamento da Doença Celíaca	23
1.3.3 Prevalência da Doença Celíaca	25
1.4. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION	27
1.5. MÉTODOS DE DETECÇÃO	28
1.6. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVOS GERAIS	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. AMOSTRAS	34
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA AMOSTRAS E CONTROLES	35
3.2.1. Método CTAB:	35
3.3 PCR	36
3.4. DETECÇÃO DE GLÚTEN MÉTODO ELISA – MÉTODO OFICIAL -120601 (AOAC, 2005)	37
3.4.1 Princípio do Teste	38
3.4.2 Reagentes Fornecidos	39
3.4.3 Equipamentos e reagentes necessários, mas não fornecidos	39
3.4.4. Extração com solução coquetel (Art. No. R7006)	40
3.4.4.1. <i>Procedimento da extração com solução coquetel</i>	40
3.4.5. Preparação do teste	41
4. RESULTADOS	43
4.1 RESULTADOS PCR	43
4.1.1 Para biscoitos rotulados com a inscrição “não contém glúten”	43
4.1.2 Para biscoitos rotulados com a inscrição “contém glúten”	44
4.2 RESULTADOS ELISA R5	46
4.2.1. Elaboração da curva padrão de gliadina	46
4.2.2 Resultado geral ELISA	49
4.2.3 Para biscoitos rotulados com a inscrição “não contém glúten”	49
4.2.4 Para biscoitos rotulados com a inscrição “contém glúten”	50
4.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS PCR X ELISA R5	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXO A – SOLUÇÕES CTAB	73
ANEXO B – FOTOS GÊIS PCR	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. AUTENTICIDADE ALIMENTAR

Os consumidores têm o direito à informação clara e correta dos produtos alimentícios. A informação dada aos consumidores é essencial para a escolha de um ou outro produto alimentar. Eles podem escolher os alimentos pelo seu estilo de vida ou conceitos religiosos (como vegetarianismo, preferência por alimentos orgânicos, ausência de carne de porco para os Judeus e Muçulmanos, por exemplo) ou aspectos de saúde (como ausência de amendoins, lactose ou glúten para indivíduos com alergias e intolerâncias). Portanto, a descrição e/ou rotulagem dos alimentos deve ser honesta e precisa, particularmente se o alimento sofreu algum processamento que remova a habilidade para distinguir um ingrediente de outro (WOOLFE; PRIMROSE, 2004).

Existem várias formas nas quais o alimento pode ser falsificado: 1) substituindo um ingrediente por um similar mais barato; 2) adulterando o alimento com um ingrediente básico, como a água; 3) não declarando algum processo, por exemplo, um congelamento prévio ou irradiação e 4) declarando uma quantidade falsa de um dos ingredientes ou não declarando a sua presença (WOOLFE; PRIMROSE, 2004).

A autenticidade alimentar é um tópico de grande interesse para as autoridades sanitárias, pois com a incorreta rotulagem podem-se ocasionar consequências significativamente negativas para o consumidor (LOCKLEY; BARDSLEY, 2000).

A indústria global de alimentos enfrenta diversos desafios em termos de proporcionar confiança na autenticidade dos alimentos. Garantir que os alimentos estejam corretamente rotulados para a presença e níveis de ingredientes específicos, a ocorrência de organismos geneticamente modificados (OGM), e prevenir que ingredientes caros sejam substituídos por outros de preço inferior de forma fraudulenta, são algumas das muitas questões (BURRELL et al., 2011).

A aplicação de sistemas da qualidade na cadeia alimentar requer o desenvolvimento de ferramentas simples e confiáveis que facilitem o controle da avaliação de rotina. A prevenção de práticas fraudulentas na rotulagem dos alimentos constitui uma parte importante do controle regulatório dos alimentos (KOH et al., 1998; SAEZ et al., 2004).

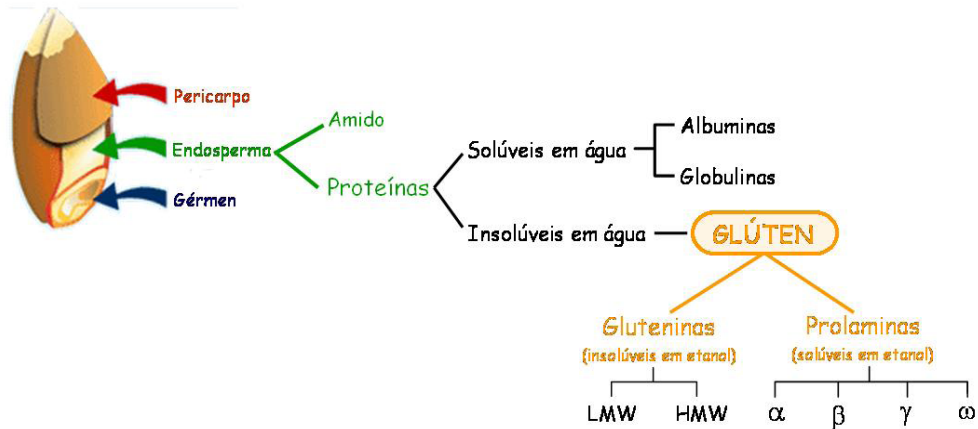
Pode-se dizer que existem duas estratégias sendo desenvolvidas como resposta a necessidade de manter e fortalecer a verdade aos consumidores com relação a qualidade e origem de alimentos no mercado. Uma é o controle de todas as etapas na produção, com a aplicação da Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC). A segunda é o desenvolvimento analítico de ferramentas para monitorar a composição de materiais processados ou não, com este objetivo os métodos analíticos baseados em ácido desoxirribonucleico (DNA) tem sido desenvolvidos e aplicados na identificação e quantificação de várias espécies, e também como “impressão digital” e identificação de genótipos e variedades de plantas para determinar a autenticidade (POPPING, 2002; TERZI et al., 2005).

1.2. O GLÚTEN

No caso dos cereais, além da autenticidade alimentar também se determina a segurança alimentar em virtude do consumo de trigo e produtos relacionados, em particular, os cereais: trigo, cevada, centeio e triticale, que contém proteínas que são tóxicas a indivíduos afetados pela Doença Celíaca (DC) e conseqüentemente, métodos analíticos são requeridos para avaliar se os produtos rotulados como “ Não contém glúten” e proteínas relacionadas de outras espécies estão realmente isentos dessa substância (SHAN et al., 2002; TERZI et al., 2005; MAFRA et al., 2008).

A Comissão do *Codex Alimentarius* define o glúten como “a fração proteica do trigo, cevada, centeio e aveia, suas variedades cruzadas e derivados, a que algumas pessoas são intolerantes e que é insolúvel em água e numa solução de 0,5 M de cloreto de sódio”. O glúten consiste numa mistura de proteínas presentes no endosperma de alguns tipos de grãos de cereais (Figura 1). Estas proteínas estão classificadas em dois grupos: as prolaminas (solúveis em etanol) e as gluteninas (insolúveis em etanol) (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

Figura 1 – O grão de trigo e a sua constituição



FONTE: PITÉ, M. R., 2007.

Prolaminas são definidas como a fração do glúten, que pode ser extraída por 40-70% de etanol (CODEX ALIMENTARIUS, 2008). Estas diferem de acordo com o tipo de cereal: gliadina no trigo, secalina no centeio, hordeína na cevada e avenina na aveia. As prolaminas são as verdadeiras responsáveis pela Doença Celíaca. São também designadas por α -, β -, γ - e ω -prolaminas de acordo com a sua mobilidade em eletroforese a valores de pH baixo e de acordo com a sua sequência de aminoácidos (PITÉ, 2007)

Ensaio feitos em cultura de células de intestino delgado demonstraram que as gliadinas α , β , ω e seus fragmentos formados por digestão péptica estimularam monócitos e aumentaram interleucina 8 e a produção de interferon α , produzindo efeito tóxico ao paciente celíaco (DEWAR et al., 2006). As subunidades de glutenina de alto peso molecular estimularam células do intestino delgado de celíacos e produziram aumento de interleucina 5 após 2 horas ao desafio (SHIDRAWI et al., 1995).

Alguns indivíduos com doença celíaca podem ser sensíveis às proteínas existentes na aveia (BARBOSA et al., 2007). Existem, até o presente momento, divergências quanto à toxicidade das prolaminas da aveia para os celíacos (STORSRUD et al., 2003). Um dos motivos que explica que alguns pacientes toleram a aveia é o seu baixo conteúdo de prolaminas que corresponde somente a 10-15% da proteína total do grão, enquanto, o trigo, o centeio e a cevada, apresentam quantidades bem superiores de prolaminas, respectivamente, 40-50%, 30-50% e 35-45% da proteína total (THOMPSON, 1997).

Uma propriedade comum entre as prolaminas do trigo, centeio e cevada consiste no alto conteúdo dos aminoácidos glutamina (>30%) e prolina (17%), enquanto as prolaminas não tóxicas do arroz e do milho apresentam baixo teor dos mesmos, predominando os aminoácidos alanina e leucina (Tabela 1). A aveia possui uma composição intermediária de glutamina e prolina, tendo por isso a toxicidade de suas prolaminas questionada (SCHUPPAN, 2000).

Tabela 1: Toxicidade dos cereais na doença celíaca

CEREAL	PROLAMINAS	COMPOSIÇÃO	TOXICIDADE
Trigo	α -gliadina	36% Gln, 17-23% Pro	+++
Centeio	Secalina	36% Gln, 17-23% Pro	++
Cevada	Hordeína	36% Gln, 17-23% Pro	++
Aveia	Avenina	Alta Gln, Alta Ala, Leu	+
Milho	Zeína	Baixa Gln, Alta Ala, Leu	-
Milheto	?	Baixa Gln, Alta Ala, Leu	-
Arroz	?	Baixa Gln, Alta Ala, Leu	-

FONTE: SCHUPPAN, 2000: Ala: alanina; Gln: glutamina; Leu: leucina; Pro: prolina

1.3. A DOENÇA CELÍACA

Samuel Gee em 1888 descreveu a Doença Celíaca sob a denominação de “afecção celíaca”. Gee em seus escritos já previa a cura da doença através da alimentação, com a diminuição da ingestão de farináceos (GEE, 1888).

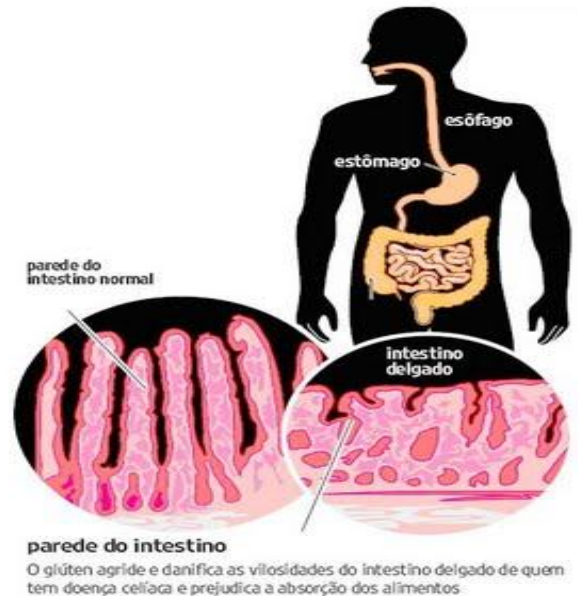
Porém foi durante a 2ª Guerra Mundial que Dicke e colaboradores (1953), pediatra holandês, observou que durante o racionamento de trigo a incidência da afecção celíaca em crianças havia diminuído muito. Posteriormente, quando os aviões suecos despejaram pães para a Holanda, as crianças rapidamente voltaram a apresentar os sintomas. Os mesmos pesquisadores demonstraram que retirando o trigo da dieta, os sintomas desta doença desapareciam.

A Doença Celíaca é uma intolerância permanente ao glúten, apresenta uma forte condição hereditária, constituindo-se numa enfermidade multifatorial, envolvendo tanto componentes genéticos, como ambientais na sua etiopatogenia (KING ; CICLITIRA, 2000). É caracterizada por atrofia total ou subtotal das vilosidades do intestino delgado proximal e consequentemente, levando à má absorção da grande maioria dos nutrientes em indivíduos geneticamente susceptíveis (SDEPANIAN et al., 1999).

A DC acomete principalmente a região proximal do intestino delgado, com dano mais intenso no duodeno e jejuno proximal, porém, em alguns indivíduos pode envolver todo o intestino (CICLITIRA; MOODIE, 2003) (Figura 2). A gravidade dos sintomas não é necessariamente proporcional à extensão das lesões da mucosa, sendo que pacientes com atrofia total de vilosidade podem ser assintomáticos ou apresentarem sintomas subclínicos. Em alguns casos podem ser observadas anormalidades na mucosa gástrica e retal (BAI *et al.*, 2005).

Áreas nobres de absorção poderão ser afetadas devido à localização da lesão, ocorrendo assim má absorção de ferro, ácido fólico, cálcio e vitaminas lipossolúveis, culminando em deficiência destes componentes e redução da densidade óssea. Atrofia das vilosidades, hiperplasia e alongamento das criptas, infiltração linfocítica no epitélio e aumento da densidade de células inflamatórias na lâmina própria correspondem às anormalidades histopatológica clássica na DC, sendo tal aumento decorrente da presença de plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e polimorfonucleares (DEWAR; CICLITIRA, 2005) (Figura 3).

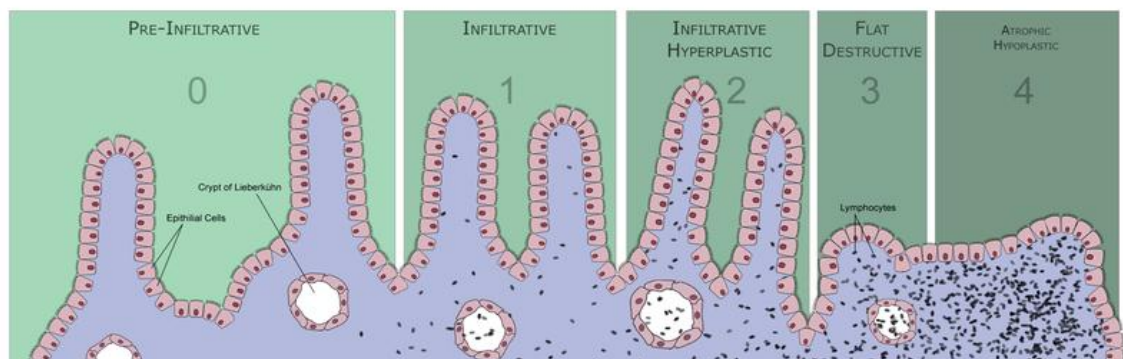
Figura 2 – Atrofia da mucosa intestinal



FONTE: http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Doença_Celíaca.

Figura 3- Caracterização dos 4 estágios de agressão da mucosa intestinal

UPPER JEJUNAL MUCOSAL IMMUNOPATHOLOGY



FONTE: http://autoimunes.wix.com/doenca-autoimunes#!_page-25

A doença afeta ambos os sexos e pode ocorrer em qualquer idade; poderá surgir na infância, assim que são introduzidos na alimentação os primeiros grãos de cereais ou posteriormente, desencadeada por fatores externos (ABREU et al, 2006).

As proteínas do glúten são relativamente resistentes às enzimas digestivas, resultando em derivados peptídeos que podem levar à resposta imunogênica em pacientes com DC (SILVA; FURLANETTO, 2010). A interação entre o sistema imunológico e o glúten pode se expressar em diferentes níveis: enteropatia ou lesão intestinal (doença celíaca), dano na pele (dermatite herpetiforme), na mucosa oral (estomatite aftosa de repetição), nas articulações (algumas artrites) ou nos rins (nefropatia por IgA) (KOTZE, 2004a).

A DC pode se apresentar sob as seguintes formas: clássica, não clássica e assintomática (POLANCO,1996; WALKER-SMITH; MURCH, 1999). Samuel Gee, em 1888, descreveu a forma clássica da doença, a qual se inicia nos primeiros anos de vida com diarreia crônica, vômitos, irritabilidade, anorexia, déficit de crescimento, distensão abdominal, diminuição do tecido celular subcutâneo e atrofia da musculatura glútea. Esta forma de apresentação foi a mais freqüente nos três estudos brasileiros realizados na década de 1980 (KODA; BARBIERI,1983; BARBIERI et. al, 1993).

A forma não clássica da DC manifesta-se mais tardiamente, com quadro mono ou paucissintomático. Os pacientes deste grupo podem apresentar manifestações isoladas, como por exemplo, baixa estatura, anemia por deficiência de ferro refratária à ferroterapia oral, hipoplasia do esmalte dentário, constipação intestinal, osteoporose, esterilidade, artralgia ou artrite e epilepsia associada à calcificação intracraniana. O reconhecimento da forma assintomática da doença, especialmente entre familiares de primeiro grau de pacientes celíacos, tornou-se mais fácil a partir do desenvolvimento de marcadores sorológicos específicos para a DC (SDEPANIAN et al., 2001a).

A dermatite herpetiforme é considerada uma variante da DC e se caracteriza por uma sensação de queimadura intensa e pruriginosa (lesões avermelhadas, com algum relevo e formação de pequenas bolhas) que ocorrem sobre a pele nas áreas extensoras dos antebraços, joelhos, cotovelos, couro cabeludo, nuca e nádegas (CICLITIRA; MOODIE, 2003). A osteoporose, o raquitismo e a osteomalácia também são anormalidades ósseas associadas à DC. A perda óssea esta relacionada à deficiente absorção de cálcio que ocorre devido à atrofia da mucosa do intestino (KALAYCI et al., 2001)

Um sinal bastante frequente e comum na forma clínica silenciosa da DC é a hipoplasia do esmalte dentário, sendo possivelmente a única manifestação da doença em crianças e adolescentes celíacos não tratados. A hipoplasia de esmalte é a anormalidade mais comum no desenvolvimento do esmalte dentário. A lesão caracteriza-se como um defeito no tecido do esmalte devido a uma injúria às células produtoras e geralmente adquire coloração amarelada. Esta injúria pode ter inúmeras causas, geralmente de ordem sistêmica, dentre elas as desordens nutricionais (RAUEN et al., 2005).

Quando não tratada a DC pode ter um prognóstico reservado, evoluindo em associação a uma série de patologias como: esterilidade, osteoporose, endocrinopatias, distúrbios neurológicos e psiquiátricos, doenças hepáticas, doenças do sistema conjuntivo e associação com doenças auto-ímmunes, tais como dermatite herpetiforme, *diabetes mellitus*, deficiência seletiva de IgA e doenças da tireóide. Quando esses pacientes são comparados à população em geral, apresentam maior risco de desenvolver enteropatia associada ao linfoma de célula T, ao carcinoma de faringe e esôfago e ao adenocarcinoma de intestino delgado (FARO, 2008). Segundo Bai e colaboradores (2005), o risco de complicações malignas, como o câncer de intestino, pode aumentar, caso a DC permaneça sem diagnóstico ou sem tratamento por longos períodos.

1.3.1 Diagnóstico da Doença Celíaca

O diagnóstico de DC deve ser baseado no exame clínico, por meio de exame físico e anamnese detalhada, além da análise histopatológica do intestino delgado, e dos marcadores séricos. O diagnóstico final deve sempre basear-se na biópsia intestinal, a qual deve revelar a anormalidade da mucosa do intestino delgado proximal, com vilosidades atrofiadas ou ausentes, aumento no comprimento das criptas e no número de linfócitos intra-epiteliais. Estão identificados vários padrões histológicos que englobam linfocitose intra-epitelial, hiperplasia das criptas e diversos graus de atrofia vilositária (FARO, 2008)

Após o surgimento de testes sorológicos de alta acurácia e maior atenção dos médicos para manifestações atípicas, tem aumentado a prevalência de DC e seu diagnóstico fora da faixa pediátrica. A prevalência é estimada em torno de 1: 100 na população em geral (SILVA; FURLANETTO, 2010).

São utilizados para o diagnóstico testes sorológicos específicos, como pesquisa de anticorpos anti-endomísio e anti-transglutaminase. Estes marcadores apresentam uma especificidade e sensibilidade de 90 a 95%, sendo, no entanto necessário confirmar o diagnóstico através da realização de uma pequena biopsia intestinal, que deve ser preferencialmente repetida alguns meses após introdução da dieta sem-glúten (RODRIGUES; JENKINS, 2006).

A sorologia deve ser feita após a determinação dos níveis séricos de imunoglobulinas, pois cerca de 12% dos celíacos apresentam também deficiência de imunoglobulina A (IgA) e poderão apresentar resultados falso-negativos. Nestes casos, haverá necessidade de se realizar testes com imunoglobulina G (IgG).

Anticorpos antiendomísio (EmA IgA)

São anticorpos da classe IgA diretos contra a camada linear da musculatura lisa e correlaciona-se com a gravidade da lesão mucosa.

Unem-se ao endomísio, produzindo um padrão característico visualizado pela imunofluorescência indireta. Até mesmo baixos títulos de anticorpos IgA anti-endomísio (AEm) são específicos para a DC, constitui-se num poderoso exame específico para esta patologia (KOTZE et. al., 1999) é útil não só na detecção de DC ativa como na sua forma silenciosa ou potencial. Kotze e colaboradores (2001) encontraram 100% de sensibilidade e 99,3% de especificidade em celíacos brasileiros. É excelente para diagnóstico, monitoração da dieta, rastreamento de familiares de celíacos e detecção de DC como co-morbidade em outras patologias auto-imunes (KOTZE et. al., 2004).

Anticorpos antitransglutaminase tecidual (IgA tTG)

O antígeno contra o qual o antiendomísio está dirigido é a transglutaminase tecidual (TGt). É utilizado o método enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) para a detecção do anti-Transglutaminase tecidual (anti-tTG) IgA. Atualmente está amplamente disponível, mais fácil de ser realizado, menos operador-dependente e mais barato que a imunofluorescência utilizada para a detecção do antiendomísio IgA. A desvantagem é que podem dar níveis considerados positivos em outras doenças sistêmicas ou gastrintestinais, que não a DC. Utiyama e colaboradores (2002) em estudo brasileiro, demonstraram que o anti-endomísio (EmA) e a anti-tTG se correlacionam bem, mas nos pacientes com baixos níveis de anticorpos o EmA é superior (KOTZE et. al, 1999).

1.3.2 Tratamento da Doença Celíaca

O tratamento consiste em dieta isenta de glúten. Ainda não foi possível estabelecer uma dose diária admissível de glúten, devido à existência de variações individuais de susceptibilidade e de sintomatologia. Ensaios clínicos recentes, sugerem uma dose diária admissível de 50 mg de glúten por dia (CATASSI et al, 2007).

A dieta isenta de glúten consiste na supressão total e permanente da ingestão de trigo, centeio, cevada ou aveia e seus derivados, devendo atender às necessidades nutricionais do paciente de acordo com a idade. Após a retirada do glúten da dieta a resposta clínica é rápida, havendo desaparecimento dos sintomas gastrointestinais e melhora da saúde dentro de dias ou semanas (CICLITIRA et al., 2005).

O glúten pode ser substituído pelo milho (farinha de milho, amido de milho, fubá), arroz (farinha de arroz), batata (fécula de batata), e mandioca (farinha de mandioca e polvilho) (SDEPANIAN et al., 1999).

As mudanças dos hábitos alimentares e de adaptação ao novo estilo de vida sem glúten são um enorme desafio para a maioria das pessoas portadoras da doença celíaca. A aderência a uma dieta isenta de glúten é associada a uma série de fatores, tais como a presença de outras intolerâncias alimentares, a preocupação com os custos de um alimento sem glúten, a preocupação de contaminação acidental ou proposital por glúten, a capacidade de seguir uma dieta isenta de glúten fora de casa, além de envolver o estado emocional do paciente, como estado de humor ou estresse (LEFFLER *et al.*, 2008).

Em um estudo desenvolvido por Usai e colaboradores (2007) observou-se que pacientes que seguem uma dieta restrita em glúten quando comparados aos que não seguem, possuem melhor qualidade de vida no que se relaciona a saúde em geral.

A transgressão da dieta pode ocorrer de forma voluntária ou involuntária. A primeira ocorre em todas as faixas etárias e pelo próprio desejo do paciente, já a segunda pode ocorrer devida à incorreta inscrição dos ingredientes nos rótulos dos alimentos ou à contaminação com glúten de determinado produto industrializado, que pode acontecer desde a colheita da matéria-prima até a comercialização do alimento (SDEPANIAN *et al.*, 2001b).

A intolerância a cereais como trigo, centeio, cevada e aveia em indivíduos celíacos é um fator agravante, uma vez que os produtos de panificação são produzidos, em sua grande maioria, utilizando o trigo como base da formulação. Além disso, as empresas de panificação e supermercados, geralmente, utilizam processo misto de fabricação, ou seja, em uma única linha de produção fabricam produtos com e sem glúten. Dessa maneira, a adoção de sistemas de qualidade, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e dos Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs), por esses estabelecimentos torna-se indispensável para garantir a qualidade e a segurança dos produtos elaborados e rotulados como “não contém glúten”.

A necessidade de segurança alimentar para os produtos isentos de glúten está baseada no fato de que o consumidor procura alimentos rotulados como “não contém de glúten” e com garantia demonstrável dessa isenção. É pensando nisso que as associações de apoio e luta pelos direitos dos celíacos vêm, historicamente, tentando conquistar instrumentos em benefício dos portadores de tal moléstia (BICUDO, 2010).

1.3.3 Prevalência da Doença Celíaca

A DC é descrita como uma afecção de distribuição mundial, tendo sido relatada na Europa, América do Norte, América do Sul, Índia, Austrália e Nova Zelândia. Ocorre com maior frequência nos países anglo-saxônicos e nórdicos, em indivíduos de origem caucasóide, e raramente afeta nativos africanos, japoneses ou chineses (HOULSTON; FORD, 1996).

A doença atinge todas as idades, especialmente crianças de seis meses a cinco anos, acometendo tanto indivíduos do sexo masculino como feminino, sendo mais frequente nas mulheres na proporção de 2:1 (PRATESI; GANDOLFI, 2005).

Por volta de 1950 a prevalência da DC era estimada em aproximadamente 1: 1300 na população européia, sendo que os indivíduos afetados eram diagnosticados baseados somente nos sintomas clínicos (DAVIDSON; FOUNTAIN, 1950). No final dos anos 90 essa estimativa passou por grande modificação frente à disponibilidade da pesquisa dos anticorpos característicos para a afecção. Foram realizadas novas pesquisas, não apenas com pacientes clinicamente sugestivos, mas também com a população de risco para desenvolvimento da DC. Estes estudos permitiram a descoberta de formas assintomáticas ou atípicas da doença tanto na população geral, como entre os indivíduos de risco, representados muitas vezes pelos familiares de pacientes celíacos, subestimando assim a prevalência da DC no passado (BRANSKI; TRONCONE, 1998).

Os estudos de triagem para DC entre doadores de sangue de diversos países iniciaram na década de 90, tendo como modelo a pesquisa realizada na Suécia no ano de 1991 na qual, para obtenção de uma taxa de prevalência de 1: 256, os pesquisadores utilizaram dados da sorologia e da biópsia intestinal dos voluntários (GRODZINSKY et al., 1992). Nessa mesma linha de investigação foram obtidas as prevalências de 1: 250 nos Estados Unidos (NOT et al., 1998), 1: 400 na Itália (TREVISIOL et al., 1999), 1:300 na Holanda (ROSTAMI et al., 1999), 1: 157 em Israel (SHAMIR et al., 2002), e 1: 166 no Irã (SHAHBAZKHANI et al., 2003).

No Brasil, em decorrência da alta miscigenação racial, esta doença já foi descrita inclusive em afro-brasileiros. Fica evidente, porém, maior prevalência nas regiões Sul e Sudeste do país, onde além de haver a maior densidade de população de origem caucasóide, há também uma maior oferta de recursos diagnósticos (KOTZE, 2005).

O primeiro estudo epidemiológico brasileiro utilizando dados de sorologia, demonstrou uma prevalência de 1: 681 em doadores de sangue da população de Brasília (GANDOLFI et al., 2000). Estudos posteriores indicaram prevalência de 1: 214 na população de São Paulo (OLIVEIRA et al., 2007), 1: 273 na de Ribeirão Preto, interior do Estado de São Paulo (MELO et al., 2006) e de 1: 417 na de Curitiba, Estado do Paraná (PEREIRA et al., 2006).

Estudos de segregação em famílias têm sugerido importante predisposição genética à DC, caracterizada pela prevalência de 8% a 18% entre os familiares de primeiro grau, variando de 70% a 100% entre gêmeos monozigóticos, e de aproximadamente 20% entre os gêmeos dizigóticos. Esses dados reforçam a importância do rastreamento em todos os familiares dos celíacos, enfatizando a indicação de biópsia intestinal nos positivos, mesmo na ausência de sintomatologia clínica (KOTZE et al., 2004). Os riscos são maiores em pessoas com *diabetes mellitus* e outras doenças auto-imunes, como tireoidopatias (KOTZE et al., 2006); síndrome de Down (NISHIHARA et. al, 2005); e em outras associações. A fertilidade pode estar afetada em subgrupos de pacientes; abortos de repetição e curso desfavorável de gravidez ocorrem em pacientes não diagnosticadas como celíacos, principalmente nas que tinham sintomatologia prévia (KOTZE, 2004b); quadro clínico grave pode surgir durante a gravidez ou puerpério em cerca de 17% das mulheres. Pode surgir em qualquer idade e cerca de 20% dos casos ocorrem em doentes com mais de 60 anos.

Determinados grupos têm prevalência aumentada da DC, por exemplo: parentes de primeiro grau dos indivíduos com biópsia mostrando atrofia de vilosidades têm prevalência entre 4 e 12 %; Os parentes de segundo grau parecem também ter prevalência aumentada, embora este seja definido somente pela sorologia. Pessoas com *diabetes mellitus* tipo 1 têm prevalência da DC que varia de 3 a 8 %. Os indivíduos com síndrome de Down têm prevalência da DC entre 5 e 12 %. A DC é associada também com síndrome de Turner, síndrome de Williams, deficiência seletiva de IgA e distúrbios auto-imunes.

1.4. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION

Segundo o “Codex Alimentarius Commission” da Organização Mundial de Saúde e Organização de Alimento e Agricultura (WHO/FAO), a quantidade máxima permitida para os alimentos serem considerados isentos ou “livres” de glúten, é de 20mg de glúten/kg de alimento; podendo este alimento ter sido produzido sem a adição de trigo, centeio, cevada e aveia ou ter sido especialmente tratado para reduzir o teor de glúten a quantidades inferiores a 20mg/kg. Existe também outra classe de alimentos que são tratados para ter o teor de glúten diminuído, neste caso o teor de glúten permitido é de 20-100mg de glúten/kg; não podendo estes alimentos serem comercializados como “isentos de glúten” (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

No entanto, parece que esta quantidade estabelecida pelo Codex para alimentos “isentos de glúten” supera os limites aceitos atualmente para a população celíaca, uma vez que pode haver diferenças de sensibilidade individual de cada paciente para o glúten, além do que a questão da dose mínima de glúten suficiente para causar alterações inflamatórias e morfológicas em pacientes celíacos necessita ser esclarecida.

Para a “Celiac Sprue Association” a única escolha livre de risco é “isento de glúten”, sem trigo, cevada, centeio ou aveia nos alimentos. Estes valores estão baseados na dose de glúten tolerada pelos pacientes celíacos e na análise dos alimentos livres de glúten. Estes parâmetros estão em discussão devido aos estudos terem sido realizados com pequeno número de pacientes e os alimentos livres de glúten analisados pelo *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) que utiliza anticorpo monoclonal para gliadina com sensibilidade e especificidade menor do que o ELISA R5 (BARBOSA et al., 2007).

1.5. MÉTODOS DE DETECÇÃO

A Comissão do Codex Alimentarius relata que “A análise qualitativa que indique a presença de glúten deve ser baseada em métodos relevantes como, por exemplo, métodos de ELISA e os métodos de DNA”. E descreve o “*Enzyme linked Immunosorbent Assay*”, como o método de eleição para a determinação de glúten em alimentos. (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

As gliadinas podem ser detectadas por espectrometria de massa (HERNANDO et al., 2003), cromatografia líquida de alta resolução (DU PONT et al., 2005), análise de DNA (HENTERICH et al., 2003), e métodos imunológicos (SKERRITT; HILL, 1991). A técnica imunológica adotada na detecção de glúten é o método ELISA (VÁLDES et al., 2003).

Os métodos para a análise de glúten confrontam-se com diferentes problemas, tais como natureza heterogênea dos alimentos, composição variável do glúten e dificuldade de quantificar produtos processados aquecidos ou quando o glúten estiver parcialmente hidrolisado (BARBOSA et al., 2007).

O ELISA R5 utiliza anticorpo monoclonal dirigido contra o pentaptídeo tóxico glutamina- glutamina-prolina-fenilalanina-prolina (G.G.P.F.P.) existente nas α , γ e ω gliadinas, existente em diferentes variedades de trigo, centeio, cevada e gluteninas de baixo peso molecular (OSMAN et. al., 2001). Não é cultivo dependente, é compatível com a solução de extração coquetel, sendo hábil para detectar produtos aquecidos ou não. O anticorpo não reage com as prolaminas do milho, arroz e aveia. O conteúdo de glúten no alimento é calculado levando-se em conta a estimativa de que 50% do glúten está sob a forma de gliadina (VALDÉS et. al., 2003). Estudo colaborativo realizado com dois kits comerciais ELISA R5, foram comparados. Os resultados demonstraram que a repetitividade e a reprodutibilidade dos dois kits foram aceitáveis para o teste de ELISA e garantiram uma sensibilidade 1,5 ppm de gliadina em alimentos livres de glúten (MÉNDEZ et. al., 2005).

Sandberg e colaboradores (2003) utilizaram um método de PCR (*Polimerase chain reaction*) para a discriminação específica de trigo, centeio, cevada e aveia em amostras alimentares, sendo que a sensibilidade deste método é comparável aos métodos imunológicos, com a vantagem que a PCR também discrimina entre diferentes espécies de cereais (TERZI et al., 2005).

Os métodos baseados na amplificação do DNA são menos afetados pelo tipo de processamento industrial implementado. O DNA como as proteínas sofrem desnaturação em altas temperaturas, mas tem sido observado que este pode ainda ser detectado por amplificação de fragmentos curtos (MEYER; CANDRIAN, 1996).

As seqüências de DNA únicas de uma espécie são um excelente meio de detecção e material de identificação de espécies. Este princípio tem sido aplicado extensivamente na identificação forense (BAKER; PALUMBI, 1994), parasitologia (ZARLENGA; HIGGINS, 2001), diagnóstico médico (MANGUIN et al., 2002) e ecologia microbiana (THERON; CLOETE, 2000).

Na grande maioria, os métodos para se determinar a autenticidade alimentar utilizam a PCR, como um método de amplificação de seqüências específicas de DNA ou ácido ribonucleico (RNA). Repetidas séries do ciclo envolvem a desnaturação do DNA molde, o anelamento dos *primers* ou iniciadores e a extensão dos *primers* anelados pela DNA polimerase resultando em uma acumulação exponencial de fragmentos específicos. Devido à extensão do *primer*, os produtos sintetizados em um ciclo podem servir de molde para os próximos e o número de cópias do fragmento alvo dobra a cada ciclo (ERLICH, 1992).

A introdução da DNA polimerase termoestável (*Taq* polimerase) isolada de *Thermus aquaticus* transformou a PCR numa reação simples e robusta que pode ser automatizada por um termociclador (ERLICH, 1992). *Thermus aquaticus* é uma bactéria que foi descoberta em 1965 no Parque de Yellowstone, vive em águas com temperaturas que variam de 70-75°C. Dessa bactéria foram isoladas enzimas que toleram temperaturas de cerca de 100°C. Até então, a enzima utilizada para estender os *primers* anelados era inativada pelas altas temperaturas requeridas para separar as duas bandas de DNA no início de cada ciclo da PCR. Conseqüentemente novas enzimas tinham que ser adicionadas durante cada ciclo.

Vários métodos já aplicados a rastreabilidade e autenticidade de alimentos podem ser utilizados para desenvolver sistemas de certificação visando a identificação qualitativa e quantitativa das espécies vegetais utilizadas como matérias-primas para a produção de alimentos (DA- WEN, 2008).

Marcadores de DNA já foram amplamente aplicados para autenticação e identificação de espécies de origem animal e vegetal em alimentos e para detectar organismos geneticamente modificados (OGM) ou contaminantes em alimentos e para consumo humano (MAFRA et al., 2008). Além disso, avançados protocolos de PCR em tempo real foram recentemente desenvolvidos para detectar espécies de plantas dentro de alimentos, tais como ervilha em alimentos a base de carne ou cereais contendo glúten em produtos sem glúten (ZELTNER et al., 2009; TAVOLETTI et al. 2009).

De acordo com Burrell e colaboradores (2011) métodos baseados no DNA para a determinação da autenticidade de alimentos estão se tornando cada vez mais comuns e fáceis de implementar. Estas abordagens a partir do DNA complementam resultados de uma série de outras abordagens analíticas (por exemplo: proteínas, análise química, radioisótopos, espectroscopia de ressonância nuclear magnética e espectroscopia no infravermelho) e são também aplicáveis nos casos em que ensaios de proteína não são considerados adequados à sua finalidade, por exemplo, ao analisar os alimentos altamente processados (BURNS et al., 2008). O uso do ponto final da reação em cadeia da polimerase é uma abordagem de DNA eficaz e custo eficiente para a determinação da autenticidade de alimentos (FOOD STANDARDS AGENCY, 2007).

A pesquisa tecnológica aqui apresentada utilizará a técnica molecular, denominada PCR e o método ELISA R5 para detecção de glúten em alimentos. A utilização da PCR é avaliada como uma alternativa aos métodos de detecção tradicionais, possuindo maior rapidez nos resultados, sensibilidade e especificidade. O emprego desta técnica pode ser utilizada na detecção da presença de DNA específico para confirmar a análise de alimentos onde o método de ELISA não for conclusivo (BARBOSA et al.; 2007).

1.6. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

A legislação brasileira já atenta para a problemática da rotulagem desde 1969 quando o decreto-lei nº 986, artigo 11º, item I, descreve que os rótulos deverão mencionar em caracteres perfeitamente legíveis a qualidade, a natureza e o tipo do alimento, observadas a definição, a descrição e a classificação estabelecida no respectivo padrão de identidade e qualidade ou no rótulo arquivado no órgão competente do Ministério da Saúde, no caso de alimento de fantasia ou artificial, ou de alimento não padronizado. No artigo 22º, não poderão constar da rotulagem denominações, designações, nomes geográficos, símbolos, figuras, desenhos ou indicações que possibilitem interpretação falsa, erro ou confusão quanto à origem, procedência, natureza, composição ou qualidade do alimento, ou que lhe atribuam qualidades ou características nutritivas superiores àquelas que realmente possuem.

Especificamente no caso do glúten a Lei nº 8543, de 23 de dezembro de 1992, determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten, a fim de evitar o consumo destes por portadores da Doença Celíaca.

A RDC nº 40, de 08 de fevereiro de 2002 em seu anexo dispõe no item 2.1 que todos os alimentos e bebidas embalados que contenham glúten, como trigo, aveia, cevada, malte e centeio e/ou seus derivados, devem conter, no rótulo, obrigatoriamente, a advertência: "CONTÉM GLÚTEN"; o mesmo é disposto na RDC nº 259 de 20 de setembro de 2002. Ainda na RDC 40, o item 2.2 relata que a advertência deve ser impressa nos rótulos dos alimentos e bebidas embalados em caracteres com destaque, nítidos e de fácil leitura. Excluem-se deste Regulamento as bebidas alcoólicas.

A RDC nº 137 de 29 de maio de 2003, dispõe sobre as advertências que devem estar presentes em bulas e embalagens de medicamentos comercializados no país com vistas a dar maior qualidade e segurança aos usuários e prescritores. Em seu anexo no item 14 dispõe que os produtos que contém o excipiente glúten em suas formulações, devem apresentar na bula e rotulagem das embalagens secundárias uma das seguintes advertências: "Atenção portadores de Doença Celíaca ou Síndrome Celíaca: contém Glúten" ou "Atenção: Este medicamento contém Glúten e, portanto, é contra-indicado para portadores de Doença Celíaca ou Síndrome Celíaca."

A Lei nº 10674, de 16 de maio de 2003, obriga como medida preventiva e de controle da DC que todos os alimentos industrializados contenham em seu rótulo e bula, obrigatoriamente, as inscrições "contém Glúten" ou "não contém Glúten", conforme o caso.

Visto isso, métodos analíticos sensíveis e específicos para detecção de glúten que garantam a qualidade dos alimentos para consumo de celíacos necessitam ser implantados na rotina analítica dos Laboratórios de Saúde Pública que atuam juntamente com a Vigilância Sanitária (ABREU et al., 2006).

O trabalho justifica-se em razão dos poucos trabalhos e estudos realizados neste assunto, e pelo risco que os portadores da afecção celíaca estão expostos ao consumir inadvertidamente produtos que contenham glúten em sua composição.

O estudo sendo de caráter investigativo, também aponta para a importância da correta rotulagem e para o papel da Vigilância Sanitária como o órgão responsável pelo controle de produtos de interesse à saúde.

Na Lei nº 8078 (Código de Defesa do Consumidor) de 1990 no seu artigo 6º, item III, são direitos básicos do consumidor: a informação adequada e clara dos diferentes produtos e serviços, com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade e preço, bem como sobre seus riscos.

Sendo assim, tendo em vista a importância do controle de saúde dos indivíduos portadores de DC por parte das autoridades competentes e dos meios de comercialização de alimentos seguros, faz-se necessário a identificação através de métodos alternativos qualitativos como a PCR e o método ELISA para a identificação de possíveis fraudes na rotulagem dos alimentos.

2 – OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral do estudo foi a avaliação da presença de glúten em biscoitos comercializados em estabelecimentos comerciais do município do Rio de Janeiro utilizando duas técnicas: ELISA R5 e PCR.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar a técnica de ELISA R5 para a detecção de glúten nestes alimentos através do kit Ridascreen® Gliadin (R- Biopharm AG);
- Realizar a extração do DNA de controles e amostras através do método Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB);
- Adequar o método de PCR baseado no trabalho de Sandberg e colaboradores (2003) para a detecção de DNA de trigo, centeio, cevada e aveia;
- Realizar a PCR para a detecção de DNA de trigo, centeio, cevada e aveia baseado no trabalho de Sandberg e colaboradores (2003);
- Confrontar os resultados encontrados através do ELISA R5 e da PCR;
- Comparar os resultados obtidos com as técnicas de ELISA R5 e PCR com a informação presente nos rótulos destes alimentos, confirmando se a rotulagem está correta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS

Foram adquiridas 30 amostras de biscoitos comercializados em estabelecimentos comerciais no município do Rio de Janeiro. Destes, 15 são produtos próprios para celíacos, logo rotulados com a informação “não contém glúten” e 15 produtos para a população em geral com a informação “contém glúten” na embalagem.

As amostras adquiridas eram provenientes de diferentes marcas e variedades. Os biscoitos isentos de glúten eram na sua maioria do tipo *snacks* (salgadinhos) e amanteigados provenientes de seis marcas diferentes. Já os biscoitos que segundo a rotulagem possuíam glúten, eram biscoitos simples: salgados e doces, provenientes de sete marcas diferentes. Foram excluídos da coleta de amostras, biscoitos recheados e que continham chocolate em sua composição, devido à dificuldade de extração do DNA nesses casos. As amostras foram identificadas através de numeração para que não fossem divulgadas as marcas produtoras.

Para controle positivo no caso do glúten foram utilizadas sementes de trigo, aveia, centeio e cevada. As sementes de trigo e centeio foram obtidas em loja especializada em produtos naturais e sementes, já as sementes de cevada e aveia foram adquiridas através da Cooperativa Agrária (Guarapuava- PR).

Todos os alimentos foram manipulados e aliqüotados sob critérios rígidos de assepsia. As amostras foram trituradas em triturador elétrico e armazenadas em tubo estéril vedado. Todas as superfícies e materiais foram lavados com detergente, água destilada, solução de álcool 70% (v/v) e deixados imersos durante quinze minutos em solução de hipoclorito de sódio para descontaminação antes e após a manipulação de cada amostra para que não houvesse contaminação entre as amostras ou pelo ambiente laboratorial.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA AMOSTRAS E CONTROLES

Foi utilizado o método de extração CTAB como descrito abaixo, segundo o POP do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. A extração de DNA das amostras foi realizada em triplicata.

3.2.1. Método CTAB:

A extração através do método CTAB consistiu na adição de 300µL de água deionizada estéril a microtubos contendo 100mg de amostras secas e homogeneizadas, seguidos da adição de 700µL de tampão CTAB. Os microtubos foram então incubados em banho termostático a 65° C +/- 2° C durante 1h15min, sendo homogeneizados em agitador de tubos a cada 15 minutos.

Após essa etapa foi realizada uma centrifugação por 10 minutos a 14000rpm e 500µL do sobrenadante foi transferido para microtubo de 1.5 mL contendo 200µL de clorofórmio. Os microtubos foram homogeneizados em agitador de tubos por aproximadamente 30 segundos e foi realizada uma nova centrifugação a 14000rpm por 10 minutos.

Foi transferida 500µL da camada superior para outro microtubo e adicionou-se duas vezes seu volume de tampão de precipitação com CTAB, sendo então, os microtubos homogeneizados por inversão e incubados a temperatura ambiente por 1h15min.

Os microtubos passaram por uma nova centrifugação a 14000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado obtido foi dissolvido em 350 µL de NaCl 1,2 M e adicionado 350 µL de clorofórmio, sendo homogeneizado em agitador de tubos por aproximadamente 30 segundos.

Após uma centrifugação a 14000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1.5 mL e adicionado de igual volume de álcool isopropílico gelado, sendo homogeneizado por inversão e incubado a -20°C +/- 2°C por uma noite.

Após esse período os microtubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 14000rpm por 10 minutos a 4°C. O líquido foi desprezado e o precipitado completamente seco. Ao sedimento já seco foi adicionado 50µL de água purificada e homogeneizado com pipeta. A solução foi mantida a -20°C.

As soluções utilizadas no método CTAB estão descritas no anexo A.

3.3 PCR

Para a detecção de DNA dos cereais foi utilizada a PCR baseada no trabalho de Sandberg e colaboradores (2003) para trigo, centeio, cevada e aveia. Todas as amplificações foram realizadas com 2 µL de DNA total, 1,5 mM de MgCl₂, 0,05 U/µL de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 0,5 pmoles/µL de cada primer, em um volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC 200 (*Peltier Thermal Cycler, MJ Research*), com as seguintes condições da PCR: 1 ciclo de 10 min a 95° C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 10 segundos a 67 ° C (trigo, centeio e cevada) ou a 66 ° C (aveia) e, finalmente, 8 segundos (trigo e centeio), 7 segundos (cevada), ou 5 segundos (aveia) a 72 ° C.

Os produtos da PCR foram analisados em transiluminador (UVP- Dual-Intensity Transilluminator), sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Type I-A/Agargen) a 1% durante 1hora sob corrente constante de 80V. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TBE 1X [Tris base (Sigma) 0,2M, ácido bórico (Sigma) 0,2M e EDTA (Sigma) 0,5M (pH 8,0)]. Os géis foram corados com brometo de etídeo 0,5mg/mL durante 10 minutos, e posteriormente, fotografados utilizando o fotodocumentador L-Pix EX (Loccus do Brasil LTDA., São Paulo, Brasil).

Primers que foram utilizados:

- Trigo- TAG2315F CAGAAAGCGAGTGGAAAGATGAAAG

TAG2473R GCAAGGAGGACAAAGATGAGGAA

- Centeio- SEC2599F TTTTTCAGAAAGCGAGTTCAATGATG

SEC2756R CGAGGACAAAGATGAGGAAGGTCT

- Cevada- HVH1618F ATTAATTCCCAAACCTGAACGACTA

HVH1763R CATGGCGAACAATGTGAAC

- Aveia- ASA1097F CGCTCAGTGGCTTCTAAGA

ASA1177R TTTTATTTTATTTGTCACCGCTAC

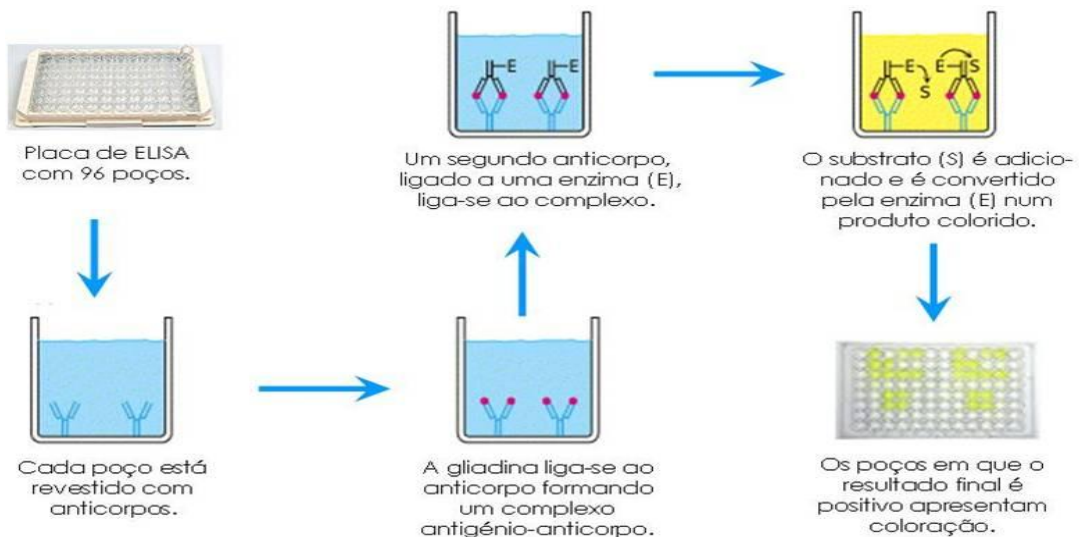
3.4. DETECÇÃO DE GLÚTEN MÉTODO ELISA – MÉTODO OFICIAL -120601 (AOAC, 2005)

Foi utilizado para a detecção de glúten em biscoitos, o Kit Ridascreen® Gliadin (R-Biopharm AG). O limite de detecção do kit é de 1,5 ng de gliadina/mL ou 3,0ng de glúten/mL (3,0ppm de glúten).

3.4.1 Princípio do Teste

A base do teste é a reação anticorpo-antígeno-anticorpo (Figura 4). Os poços de microtitulação são revestidos com anticorpos específicos para gliadina. Ao adicionar o padrão ou solução de amostra nos poços, a gliadina presente se ligará aos anticorpos específicos de captura. O resultado é um complexo antígeno-anticorpo. Os componentes não vinculados pelos anticorpos são removidos em uma etapa de lavagem. Em seguida, o anticorpo conjugado com peroxidase é adicionado. Este anticorpo conjugado é vinculado ao complexo anticorpo- antígeno. Um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo (sanduíche) é formado. Qualquer enzima não ligada ao conjugado é então removida em uma etapa de lavagem. O substrato enzimático (peróxido de uréia) e o cromógeno (tetrametilbenzidina) são adicionados aos poços e incubados. A enzima ligada ao anticorpo converte o cromógeno incolor em um produto azul. A adição do reagente de parada leva a uma mudança de cor de azul para amarelo. A medição é feita por fotometria em 450 nm. A absorbância é proporcional à concentração de gliadina na amostra.

Figura 4- Etapas do Método Elisa R5



3.4.2 Reagentes Fornecidos

Cada kit contém material suficiente para 96 medições (incluindo análise padrão). Cada kit teste contém:

1 placa de microtitulação (12 tiras removíveis com 8 poços cada) revestidos com anticorpos anti-gliadina.

6 Padrões de Gliadina, 1,3 mL cada: 0ppb (padrão zero), 5ppb, 10ppb, 20 ppb, 40 ppb, 80ppb de gliadina em solução aquosa pronto para uso.

1 Conjugado (1,2 mL) - Concentrado de anticorpo conjugado com peroxidase.

1 Substrato (7mL)- Contém peróxido de uréia.

1 Cromógeno- Contém tetrametilbenzina.

1 Solução de Parada (14 mL)- Contém 1 N de ácido sulfúrico.

1 Diluente de amostra (60 mL)- Como um concentrado 5x.

1 Tampão de lavagem (100 mL)- Concentrado 10x.

3.4.3 Equipamentos e reagentes necessários, mas não fornecidos

- Equipamentos:

Leitor ELISA (450 nm)

Centrífuga + frascos de vidro para centrífuga

Agitador de tubos

Moedor de pilão ou homegeneizador

Banho- maria (50°C/ 122° F)

Pipetas graduadas

Micropipetas de volume variável: 20 µL- 200 µL e 200 µL- 1000 µL

- Reagentes:

Solução coquetel: art. No. R7006 (105 mL)- Para preparação de amostras

Água destilada ou deionizada

Solução de etanol (60%)- necessário para a extração dos controle do ensaio. Para o preparo, adicionar 150mL de etanol p.a a 100 mL de água destilada e misturar bem.

Solução de etanol (80%)- necessário para a extração da amostra com solução coquetel. Para o preparo, adicionar 120mL de etanol p.a à 30 mL de água e misturar bem.

3.4.4. Extração com solução coquetel (Art. No. R7006)

A solução coquetel é utilizada para amostras processadas ($T > 90\text{ }^{\circ}\text{C}$) e produtos de soja, cacau, chocolate, taninos ou café (PITÉ, 2007 ; SILVA, 2010). Esta contém 250mM de 2-mercaptoetanol e 2M de cloridrato de guanidina, revela alta eficiência na detecção de gliadina e pode ser utilizada como processo geral em todos os métodos para aumentar o desempenho da análise de gliadina em alimentos (GARCIA et al., 2005).

A extração com solução coquetel permite extrair quantitativamente os agregados insolúveis das subfrações α e γ gliadinas formadas após o processamento térmico de alguns alimentos (VALDÉS et al., 2003).

3.4.4.1. *Procedimento da extração com solução coquetel (Manual do Kit Ridascreen® Gliadin- R- Biopharm AG).*

Foi pesada e moída 5g da amostra de biscoito. Foi então colocado 0,25 g de uma amostra representativa em um tubo, adicionado 2,5 mL da solução coquetel e homogeneizado. Os tubos foram incubados por 40 min a 50°C .

Após esfriar, a amostra foi misturada com 7,5mL de etanol 80% e agitada por 1 h para baixo e para cima em um agitador de tubos a temperatura ambiente ($20 - 25^{\circ}\text{C}$).

Foi então centrifugada por 10 min/ no mínimo 2500g, a temperatura ambiente (20 – 25°C) e o sobrenadante foi colocado em frasco com tampa rosqueada. A amostra foi diluída 1:12,5 (1+11,5/80µL + 920 µL) com o diluente da amostra diluído: o fator de diluição final foi de 500.

Observação: Todos os sobrenadantes obtidos após a centrifugação foram armazenados em frasco bem fechado no escuro à temperatura ambiente (20-25°C) por até quatro semanas.

3.4.5. Preparação do teste

Todos os reagentes foram colocados à temperatura ambiente (20-25 ° C) antes de serem utilizados.

O diluente da amostra é fornecido como um concentrado e apenas a quantidade realmente necessária foi diluída com água destilada (por exemplo, 3 mL de concentrado + 12 mL de água destilada, suficiente para a diluição de 10 amostras).

Uma vez que o conjugado enzimático diluído tem uma estabilidade limitada, apenas a quantidade necessária foi diluída a 1:11 (1 +10) com água destilada antes de cada análise.

O tampão de lavagem antes de ser utilizado foi diluído a 1:10 (1 +9) com água destilada. O tampão diluído é estável a 2 - 8 ° C (35-46 ° F) por quatro semanas. Antes da diluição, cristais eventualmente formados foram dissolvidos através de banho-maria à 37° C.

3.4.6. Procedimento do ensaio

A cada poço foi adicionado 100µL de cada solução-padrão ou amostras e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente (20-25 ° C).

O líquido dos poços foi então descartado, os poços preenchidos com 250µL de tampão de lavagem diluído e o líquido novamente despejado. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes

Após essa etapa de lavagem, foi adicionado a cada poço 100µL do conjugado enzimático diluído, e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente (20 - 25 ° C). Foi realizada uma nova etapa de lavagem semelhante a anterior.

Foram adicionados 50µL do substrato e 50µL do cromógeno em cada poço. A placa foi agitada manualmente e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente (20 - 25 ° C) no escuro. Foi então adicionado 100µL do reagente de parada a cada poço, agitada a placa e a absorvância medida a 450 nm.

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS PCR

4.1.1 Para biscoitos rotulados com a inscrição “não contém glúten”

O resultado quanto à presença dos cereais: trigo, centeio, cevada e aveia; avaliada pela técnica de PCR em biscoitos com a especificação no rótulo de “não contém glúten” estão dispostos na tabela 2 e no gráfico 1. As fotos dos géis podem ser visualizadas no Anexo B.

Tabela 2: Resultado do PCR para a presença dos cereais: trigo, centeio, cevada e aveia em 15 amostras de biscoitos comercializados no município do Rio de Janeiro com a inscrição “não contém glúten”.

AMOSTRAS	PCR TRIGO	PCR CENTEIO	PCR CEVADA	PCR AVEIA
1	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
2	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
3	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
4	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
5	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
6	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
7	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
8	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
9	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
10	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
11	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
12	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
13	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
14	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
15	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo

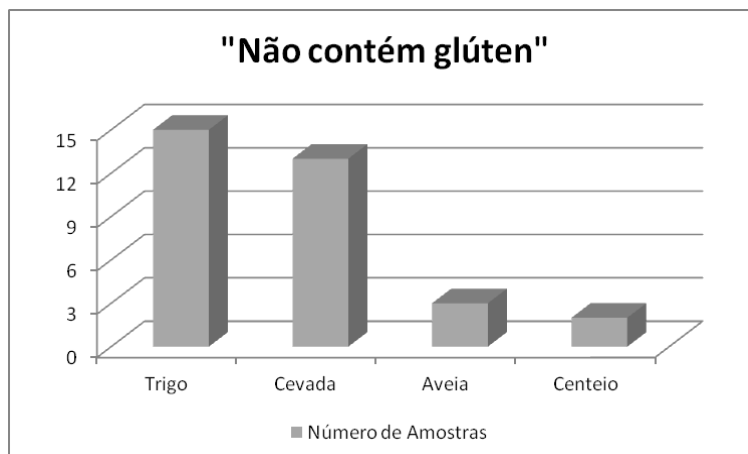


Gráfico 1: Resultados positivos de amostras rotuladas com a inscrição “não contém glúten”, analisadas através da técnica PCR de acordo com o cereal.

Podemos observar que das quinze amostras de diferentes marcas e variedade, que possuíam a inscrição “não contém glúten” no rótulo, todas foram positivas para o cereal trigo. E que dos quinze biscoitos aqui estudados, todos amplificaram para pelo menos um dos cereais, fato que demonstra uma possível contaminação no processamento de todas as amostras avaliadas com algum dos cereais.

4.1.2 Para biscoitos rotulados com a inscrição “contém glúten”

O resultado quanto à presença dos cereais: trigo, centeio, cevada e aveia; avaliada pela técnica de PCR em biscoitos com a especificação no rótulo de “contém glúten” estão dispostos na tabela 3 e no gráfico 2. As fotos dos géis podem ser visualizadas no Anexo B.

Tabela 3: Resultado do PCR para a presença dos cereais: trigo, centeio, cevada e aveia em 15 amostras de biscoitos comercializados no município do Rio de Janeiro com a inscrição “contém glúten”.

AMOSTRAS	PCR TRIGO	PCR CENTEIO	PCR CEVADA	PCR AVEIA
16	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
17	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
18	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
19	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
20	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
21	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
22	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
23	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
24	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
25	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
26	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
27	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
28	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
29	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
30	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

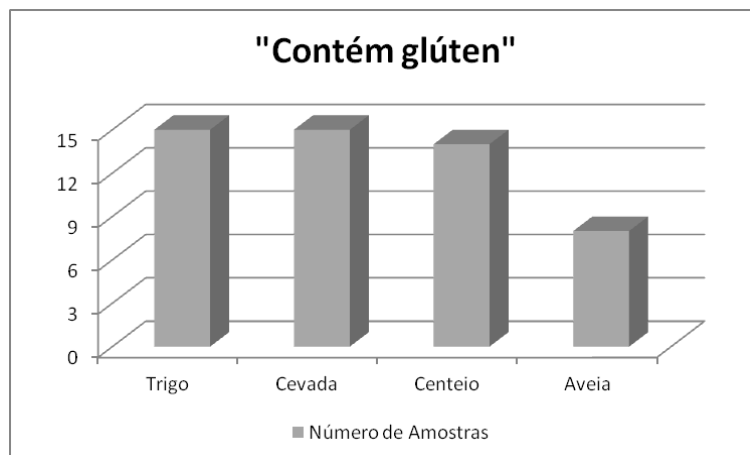


Gráfico 2: Resultados positivos de amostras rotuladas com a inscrição “contém glúten”, analisadas através da técnica PCR de acordo com o cereal.

Podemos observar que todas as amostras foram positivas para os cereais trigo e cevada. Para o cereal centeio, apenas uma amostra obteve resultado negativo e para a aveia oito amostras obtiveram resultado positivo e sete negativos.

4.2 RESULTADOS ELISA R5

4.2.1. Elaboração da curva padrão de gliadina

O curso da curva padrão é mostrado no certificado de garantia de qualidade incluso no kit. Traça-se então uma curva com 6 padrões de gliadina de concentração conhecida crescente, criando-se uma relação entre a absorvância (intensidade de coloração) e a concentração. As absorvâncias das amostras são, por interpolação na curva, relacionadas com as suas concentrações.

As Curvas Padrão de Gliadina, foram plotadas no próprio Excel e visam avaliar se o ensaio está sendo realizado da maneira correta. Se os padrões de 0, 5, 10, 20, 40 e 80µg/kg de gliadina estão obtendo a absorvância média esperada, como descrito no manual do kit (Tabela 4).

Tabela 4: Dados para elaboração da curva padrão de gliadina

Conc. gliadina (µg/kg)	Absorvância			Log concentração	Absorvância média	Conc. Calculada (µg/kg)
	replicata 1	replicata 2	replicata 3			
0		0,838	0,79		0,81	
5	0,919	0,809	0,904	0,699	0,88	5,0
10	1,11	1,066	1,326	1,000	1,17	10,0
20	1,555	1,557	1,708	1,301	1,61	20,0
40	2,2	2,109	2,228	1,602	2,18	40,0
80	2,746	2,686	2,685	1,903	2,71	80,0

A concentração de gliadina em µg / kg (ppb) é lida a partir da curva de calibração e tem de ser multiplicada pelo fator de diluição recomendado de 500. Este resultado é então multiplicado por 2, a fim de obter a concentração de glúten (gliadina geralmente representa 50% das proteínas presentes no glúten). Além disso, a fórmula obtida através da curva é utilizada para calcular a concentração de glúten no alimento.

A primeira curva constituída com soluções padrões de gliadina nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 40 e 80µg/kg obedece a equação $Y = 1,3353x$, conforme pode ser observado no gráfico 3.

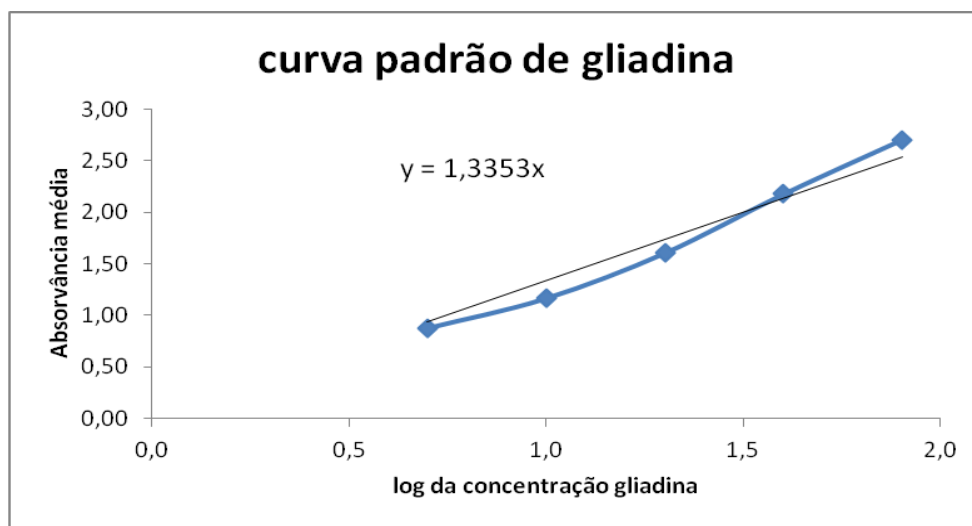


Gráfico 3: Curva Padrão de Gliadina 16/07/2012.

A segunda curva obedece a equação $Y = 1,9799x - 1,0838$, conforme pode ser observado na gráfico 4.

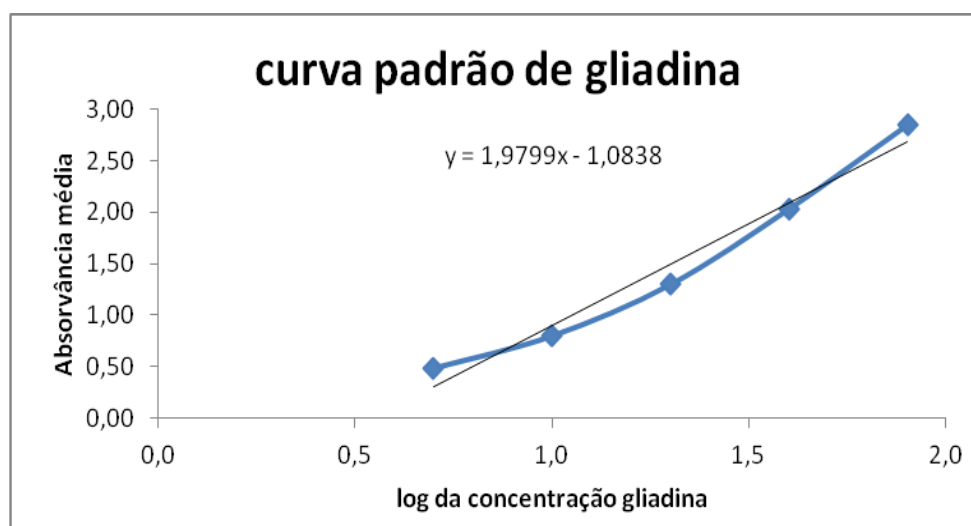


Gráfico 4: Curva Padrão de Gliadina 26/07/2012.

A terceira curva obedece a equação $Y = 1,5354x - 0,3511$, conforme pode ser observado na gráfico 5.

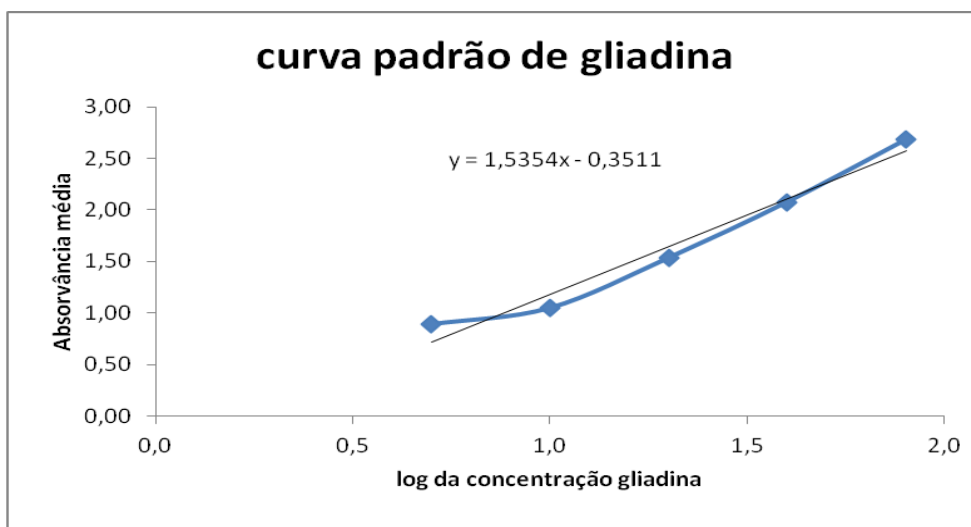


Gráfico 5: Curva Padrão de Gliadina 01/08/2012.

A quarta curva obedece a equação $Y = 1,6503x - 0,8557$, conforme pode ser observado na gráfico 6.

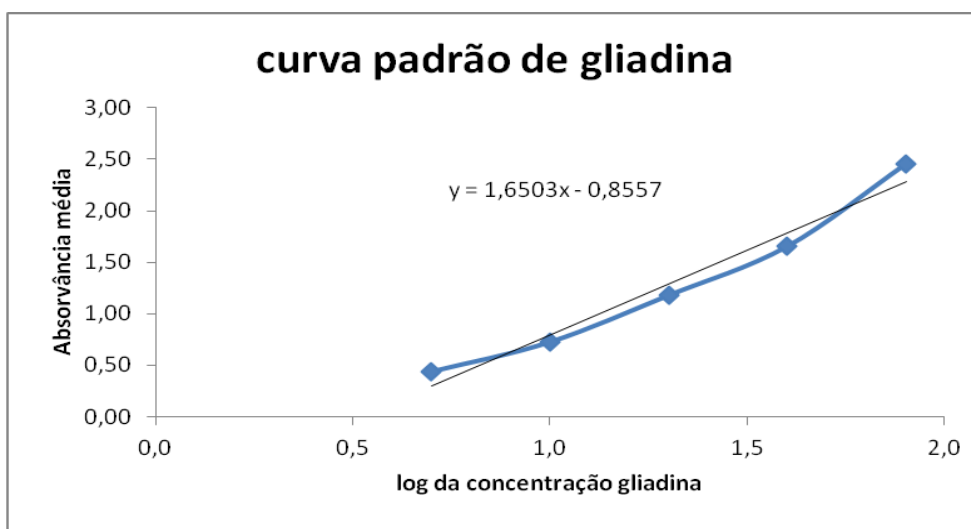
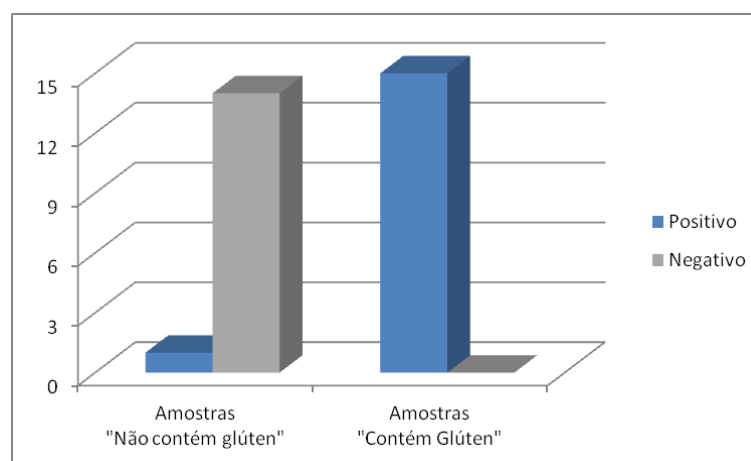


Gráfico 6: Curva Padrão de Gliadina 04/09/2012.

4.2.2 Resultado geral ELISA

Os resultados obtidos através da técnica ELISA R5 para as amostras rotuladas com as inscrições “contém glúten” e “não contém glúten” podem ser visualizados no gráfico 7.

Gráfico 7: Resultados obtidos através do ELISA para biscoitos isentos ou não de glúten.



4.2.3 Para biscoitos rotulados com a inscrição “não contém glúten”

Pelo ELISA apenas uma amostra (6,67%) obteve resultado distinto a descrição presente no rótulo. Os resultados encontrados através da técnica ELISA R5 em biscoitos com a especificação no rótulo de “não contém glúten” estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5: Resultado do ELISA R5 para a presença de glúten em 15 amostras de biscoitos comercializados no município do Rio de Janeiro com a inscrição “não contém glúten”:

AMOSTRAS	ELISA
1	Não contém glúten
2	Não contém glúten
3	Não contém glúten
4	Não contém glúten
5	Não contém glúten
6	Não contém glúten
7	Contém glúten
8	Não contém glúten
9	Não contém glúten
10	Não contém glúten
11	Não contém glúten
12	Não contém glúten
13	Não contém glúten
14	Não contém glúten
15	Não contém glúten

4.2.4 Para biscoitos rotulados com a inscrição “contém glúten”

Todos os biscoitos (100%) que possuíam a inscrição “contém glúten” obtiveram resultados positivo para a técnica ELISA. Tais resultados estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6: Resultado do ELISA R5 para a presença de glúten em 15 amostras de biscoitos comercializados no município do Rio de Janeiro com a inscrição “contém glúten”.

AMOSTRAS	ELISA
16	Contém glúten
17	Contém glúten
18	Contém glúten
19	Contém glúten
20	Contém glúten
21	Contém glúten
22	Contém glúten
23	Contém glúten
24	Contém glúten
25	Contém glúten
26	Contém glúten
27	Contém glúten
28	Contém glúten
29	Contém glúten
30	Contém glúten

4.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS PCR X ELISA R5

A comparação dos resultados encontrados com as duas técnicas estão descritos na Tabela 7. Ao avaliarmos os produtos tidos como “contém glúten”, ambas as técnicas apresentaram o mesmo resultado.

No entanto, para as amostras de biscoitos rotuladas como “não contém de glúten” os resultados foram bastante divergentes: Através do ELISA apenas a amostra de número 7 obteve uma concentração de gliadina superior a 20ppm, indicando que ela contém glúten. Já pela PCR todas as amostras amplificaram para o trigo e para ao menos mais um cereal, fato este que demonstra que o produto apesar de ser direcionado a população celíaca estava contaminado com esses cereais.

É importante ressaltar que a PCR não avaliou diretamente a presença de glúten nesses alimentos, mas sim a utilização desses cereais na composição do produto através da presença ou não do DNA do cereal. Logo, esses cereais podem ter sido utilizados durante a fabricação do alimento, mas pelo tipo de processamento utilizado a proteína do glúten pode ter sido hidrolizada e no produto final já não estava presente em quantidade detectável para a técnica de ELISA; sendo então o produto considerado isento de glúten.

Verificou-se também, que os cereais que são os prováveis responsáveis pela amostra 7 ter sido considerada positiva para a presença de glúten através da técnica ELISA foram trigo e cevada. Uma vez que essa amostra obteve resultado positivo através da PCR para esses dois cereais.

Tabela 7: Comparação dos resultados encontrados com as técnicas ELISA R5 e PCR em 15 amostras de biscoitos com a inscrição “não contém glúten” e 15 amostras com a inscrição “contém glúten” comercializados no município do Rio de Janeiro.

AMOSTRAS	DESCRIÇÃO RÓTULO	ELISA	PCR TRIGO	PCR CENTEIO	PCR CEVADA	PCR AVEIA
1	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
2	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
3	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
4	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
5	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
6	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
7	Não contém glúten	Contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
8	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
9	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
10	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
11	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
12	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
13	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
14	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
15	Não contém glúten	Não contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
16	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
17	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
18	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
19	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
20	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
21	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
22	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
23	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
24	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
25	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
26	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
27	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
28	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
29	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
30	Contém glúten	Contém glúten	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

5. DISCUSSÃO

Abreu e colaboradores (2006) avaliaram a presença de glúten através da mesma técnica utilizada no presente estudo (ELISA R5) e obtiveram resultados semelhantes. Em amostras de creme de arroz, amido de milho, biscoito salgado, biscoito tipo chips, lasanha, farinha de soja e macarrão, concluíram que exceto o macarrão, todos os outros produtos alimentícios estavam isentos de glúten, conforme indicava a rotulagem. Já as amostras que apresentavam a advertência “contém glúten” foram todas positivas, estas compreendiam: biscoito artesanal tipo sequilho, farinha de aveia, biscoito maisena e biscoito integral (de aveia e mel), farinha de centeio e cevada torrada moída.

Silva (2010), ao analisar através da mesma metodologia alimentos que possuíam a descrição “contém glúten”, encontrou em apenas 16,7% dos produtos a presença do glúten em quantidades que permitem o alimento ser rotulado como “contém glúten”. Resultado diferente ao encontrado no presente estudo, onde todas as amostras (100%) que continham glúten tiveram seu dado confirmado pela técnica ELISA.

Gelinas e colaboradores (2008) avaliaram através da técnica ELISA a contaminação por glúten em alimentos industrializados rotulados como “não contém glúten” e observaram a taxa de contaminação de 9,1%, valor semelhante ao obtido no presente trabalho (6,67%). Silva (2010) em seu estudo encontrou 13% dos alimentos próprios para a população celíaca, com um teor de glúten superior a 20ppm, fato que indica a contaminação destes produtos. Foi então analisado um segundo lote destes mesmos produtos, e 60% deles continuaram apresentando contaminação por glúten em alimentos onde sua presença não é aceitável. Cabe ressaltar, que a informação presente no rótulo é de extrema importância para os portadores da DC, uma vez que o tratamento é baseado na isenção do glúten da dieta e o consumo desavisado de um alimento que contenha essa proteína pode desencadear crises e retorno dos sintomas.

Bicudo (2010) avaliou a presença de glúten por meio de ensaio imunoenzimático ELISA R5, nas diferentes fases do processamento de tortilhas doces e salgadas de farinha de arroz, rotuladas como “não contém glúten”. Os resultados obtidos no imunoensaio revelaram um teor de 7,07 mg.kg⁻¹ de glúten para a tortilha doce e 7,60 para tortilha salgada, fato este que confirma a inscrição “não contém glúten” presente na rotulagem, pois segundo o Codex Alimentarius, o limite máximo de glúten em alimentos elaborados a partir de ingredientes que não são fontes de glúten é de 20 ppm ou 20mg. kg⁻¹.

Sdepanian e colaboradores (2001c), quando avaliaram a presença de glúten através da mesma técnica, em 108 amostras de alimentos preparadas por portadores de doença celíaca e/ou seus familiares e 92 amostras de produtos industrializados, concluíram que os alimentos sem glúten foram preparados adequadamente pelos portadores de DC e/ou seus familiares e a maioria dos produtos industrializados não continha glúten ou se encontrava dentro dos limites permitidos pela Comissão do Codex Alimentarius.

Outro estudo realizado por Capparelli e colaboradores (2004) que analisaram amostras isentas de glúten - 30 tipos de macarrão e 30 diferentes tipos de farinha – mostrou que, apenas 1 apresentou contaminação acima do permitido; as amostras que eram a base de arroz e milho não apresentaram contaminação por glúten.

Segundo Dahinden e colaboradores (2001): “Nos produtos escolhidos não houve nenhum caso de um produto livre de trigo contendo gliadina, fato que seria um indicativo de que gliadina purificada é usada como um aditivo alimentar.” Resultado divergente ao encontrado no presente estudo, já que a amostra 7 apresentou um teor de gliadina superior ao permitido e esse era um produto rotulado como “não contém glúten”.

Em um outro estudo, Storsrud e colaboradores (2003), analisando amostras de farinha de arroz e milho, produtos naturalmente isentos de glúten, detectaram índices de contaminação em aproximadamente 41% dos alimentos investigados; valor este muito maior que o encontrado nas outras pesquisas. Um dos grandes problemas nos produtos isentos de glúten é a contaminação das matérias primas (GELINAS et. al, 2008 ; SDEPANIAN et. al, 2001c) e a contaminação cruzada que pode ocorrer em várias etapas do processo de produção destes alimentos. A contaminação da matéria prima compromete a qualidade final dos produtos produzidos com elas, como os biscoitos, muito utilizados pela população celíaca.

Felinto (2008) avaliou a presença ou não de glúten na composição de chocolates através da técnica ELISA e comparou com as informações contidas nos rótulos desses alimentos, a fim de promover mais segurança aos portadores de DC e também ampliar as opções de consumo. O estudo demonstrou que as amostras avaliadas não apresentavam quantidades de glúten superiores ao permitido pela legislação (20ppm) e ao comparar os dados obtidos com as informações presentes nos rótulos foi verificado que todas as marcas analisadas apresentavam a informação “contém glúten”, mesmo não contendo a proteína.

Esse é um fato tão importante quanto a contaminação em produtos que deveriam ser isentos de glúten. Isso porque, essa parcela da população já sofre com a escassez de produtos próprios, o elevado valor de mercado desses alimentos e a própria restrição alimentar gerada pelo tratamento. Sendo assim, alimentos rotulados erroneamente também no que diz respeito a inexistência de glúten, podem gerar problemas até mesmo psicológicos, uma vez que restringe ainda mais as opções de consumo dos pacientes celíacos.

Olexová e colaboradores (2006) aperfeiçoaram um método baseado em PCR para a detecção de cereais que contêm glúten, em farinhas e produtos de panificação. Para demonstrar a aplicabilidade do método em produtos alimentícios, foram analisadas com sucesso quatro amostras de farinhas e 13 marcas de biscoitos designados "sem glúten". Desses, duas farinhas e uma marca de biscoitos foram positivos para cereais contendo glúten.

Sandberg e colaboradores (2003) criaram um método de PCR em tempo real para detecção específica de trigo, centeio, cevada e aveia. Tal método foi aplicado a todos os cereais puros e aos produtos alimentícios derivados deles. Os resultados dos métodos de PCR em tempo real foram comparados com os resultados obtidos com o ensaio imunoenzimático estabelecido. Uma boa correlação entre os métodos foi alcançada, como também foi relatada por Dahinden e colaboradores (2000) que avaliou 35 alimentos para bebês através da mesma técnica de Real Time PCR. O mesmo ocorreu no presente estudo, para biscoitos que continham a informação “contém glúten”, houve 100% de concordância entre as técnicas ELISA R5 e PCR.

O trabalho de Dahinden e colaboradores (2001) avaliou a presença de glúten através do ELISA e comparou os resultados com os obtidos através de uma PCR quantitativa competitiva para os cereais: trigo, cevada e centeio. Em relação aos resultados observados com os dois métodos, pode-se presumir que uma boa correlação foi obtida. Das 15 amostras, 11 apresentaram os mesmos resultados no sistema de PCR quantitativo competitivo como com o ELISA. Os autores sugerem que o sistema de PCR quantitativo competitivo pode ser utilizado como uma confirmação para a análise de amostras de alimentos caracterizadas por ELISA.

Hernández e colaboradores (2005) criaram um PCR em tempo real para detecção quantitativa de alguns cereais dentre eles, cevada e trigo. PCRs em tempo real específicas de cevada e trigo totalmente acordados com os ingredientes indicados na etiqueta dos nove produtos alimentares foram testados. O DNA de trigo foi detectado no germe de trigo, cereais matinais, no farelo de trigo integral, bisnagas de pão, biscoitos, pão e pão integral. Já o DNA de cevada foi detectado em bolos multicereais. Os resultados da cevada e trigo têm particular importância devido ao seu teor de glúten, o que não é tolerado pelos pacientes celíacos (OGASAWARA et. al, 1999).

No estudo de Köppel e colaboradores (1998) 38 amostras de aveia foram investigadas por PCR e ELISA para a contaminação por trigo. Foram 30 amostras de aveia em flocos ou grãos e 8 produtos de aveia industrialmente processadas. A detecção de gliadina por ELISA mostrou que uma amostra chegou a 38 mg de gliadina, resultado maior que o preconizado pelo Comissão do Codex Alimentarius e pela União Européia. Experimentos mostraram que em amostras enriquecidas o sistema de PCR é de cerca de 10 vezes mais sensível do que o sistema ELISA, desde que o DNA isolado seja totalmente amplificável. Assim, o DNA do trigo poderia ser detectado através de PCR nas 10 amostras que obtiveram teores de gliadina abaixo do limite de detecção do sistema de ELISA utilizado. Apenas duas das oito amostras de produtos de aveia industrialmente processadas continham DNA amplificável, as outras seis amostras não tinham DNA detectável. Uma amostra foi PCR positivo para trigo. No entanto, essas mesmas oito amostras continham quantidades detectáveis de gliadina no ELISA.

Hernando e colaboradores (2003) investigaram o grau de contaminação com trigo, cevada, centeio, ou uma mistura destes cereais em um grande número de grãos e produtos comerciais de aveias; além de identificarem o tipo de cereal contaminante. Os métodos ELISA R5 e PCR quantitativo em tempo real foram utilizados para analisar um total de 134 amostras de aveia, compreendendo grãos e produtos de aveia comerciais coletados na Europa, Estados Unidos e Canadá. A maior parte, 109 amostras, foi principalmente contaminada com misturas de trigo, cevada e centeio, sendo a cevada o contaminante predominante. Resultado este similar ao encontrado no presente estudo, uma vez que das 30 amostras analisadas por PCR para a presença dos quatro cereais: trigo, centeio, cevada e aveia, 28 apresentaram a presença de cevada em sua composição.

Ainda de acordo com o trabalho de Hernando e colaboradores (2003), as porcentagens desses cereais nas amostras foram calculados através de sistemas PCR quantitativos em tempo real específicos para trigo, centeio e cevada. Os dados confirmaram que produtos de aveia contaminados, com base na mesma variedade, podem ter diferentes níveis de contaminação por trigo, cevada e centeio.

Visto isso, percebe-se que as implicações nutricionais de uma dieta isenta de glúten, acrescidas de baixa oferta de produtos específicos no mercado brasileiro e o panorama da legislação atual, trazem para discussão a necessidade de regulamentação de: uma metodologia adequada para detecção do glúten (ELISA R5) nos setores industriais, valores limite para o conteúdo de glúten nos alimentos isentos de glúten, rotulagem específica de modo a facilitar a população celíaca, bem como a definição de uma política de fiscalização ao final da produção dos alimentos isentos de glúten (SILVA, 2010).

É necessária também a implementação de um sistema de vigilância que investigue as possíveis fontes de contaminação dentro do processo de produção. É da mesma forma necessário o incentivo da produção nacional de alimentos livres de glúten, aumentando sua diversidade e qualidade. A legislação vigente deveria incorporar as diretrizes internacionais de detecção do glúten e definir assim, com clareza, os alimentos que podem utilizar a inscrição “livre de glúten” e “naturalmente livre de glúten”.

6. CONCLUSÃO

A técnica de ELISA R5 demonstrou ser extremamente adequada para a detecção de glúten neste tipo de alimento.

A extração do DNA tanto dos controles positivos quanto das amostras através do método CTAB mostrou-se eficaz.

Os *primers* estabelecidos por Sandberg e colaboradores se mostraram bem delineados e a técnica de PCR se mostrou efetiva e de fácil implementação.

De acordo com os resultados do ELISA e da PCR nota-se que para os produtos rotulados com a inscrição “contém glúten”, as técnicas apresentaram 100% de concordância. No entanto, para as amostras de biscoitos rotuladas como “não contém glúten” os resultados foram bastante divergentes: Através do ELISA apenas uma amostra obteve uma concentração de gliadina superior a 20ppm. Já pela PCR todas as amostras amplificaram para o trigo e para ao menos mais um cereal.

Sendo assim o estudo verificou que persiste a contaminação por glúten em alimentos destinados especificamente a população celíaca. Demonstrou ainda que a presença de glúten, principalmente em alimentos rotulados como isentos de glúten, pode ser avaliada através da técnica ELISA R5 e aponta ainda para a importância da utilização de técnicas de confirmação, como a PCR, para confirmar a contaminação e identificar quais foram os cereais contaminantes.

REFERÊNCIAS

ABREU, R. W. et al. Detecção de glúten em alimentos por meio de ELISA. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 65, n.3, p. 176-180, 2006.

A.O.A.C. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18^a ed. Washington, D.C.: A.O.A.C International, 2005.

BAI, J. et al. Celiac Disease. **World Gastroenterology News**, v. 10, n. 2, p. 1-8, 2005.

BAKER, C.S.; PALUMBI, S.R. Which whales are hunted. A molecular genetic approach to monitoring whaling. **Science**, v. 265, p. 1538–1539, 1994.

BARBIERI, D. et al. Inquérito Nacional Brasileiro sobre doença celíaca - 1989. SPGPN **Boletim Informativo**, n. 2, ano I, p.6-8, 1993.

BARBOSA, S.F.C.; ABREU, R.W.; ZENEON, O. Métodos analíticos para detecção de glúten em alimentos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n.2, p. 89-94, 2007.

BICUDO, M.O.P. **Avaliação da presença de glúten em produtos panificados para celíacos- Estudo de Caso**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 2010.

BRANSKI, D.; TRONCONE, R. Celiac disease: a reappraisal. **Journal of Pediatrics**, v. 133, n. 2, p. 181-187, 1998.

BRASIL. Ministério da Marinha de Guerra; Ministério do Exército e Ministério da Aeronáutica Militar. Decreto-Lei nº 986 - de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. (Publicado no **D.O.U.** de 21.10.1969, pág. 8935-Retificação no D.O.U. de 11.11.1969, pág. 9737. Versão Consolidada pela Procuradoria da ANVISA).

_____. Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990 (Código de Defesa do Consumidor). Dispõe sobre a Proteção do Consumidor e dá outras Providências. **D.O.U. - Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 12 de setembro de 1990.

_____. Lei nº 8543, de 23 de dezembro de 1992 da ANVISA. Determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten, a fim de evitar a doença celíaca ou síndrome celíaca. D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 24 de dezembro de 1992.

_____. Resolução RDC nº 40, de 08 de fevereiro de 2002 da ANVISA. Aprova o regulamento técnico para rotulagem de alimentos e bebidas embalados que contenham glúten, constante do anexo desta Resolução. **D.O.U. - Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 13 de fevereiro de 2002.

_____. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. **D.O.U. - Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2002.

_____. Lei nº 10674, de 16 de maio de 2003 da ANVISA. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. **D.O.U. - Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 19 de maio de 2003.

_____. Resolução RDC nº 137, de 29 de maio de 2003 da ANVISA. Autoriza, apenas, o registro/renovação de registro de medicamentos pertencentes às classes/princípios ativos, só se as bulas e embalagens contiverem a advertência pertinente. **D.O.U. - Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

BURNS, M.; SANDERS, R.; BURRELL, A. “**Strawberry and raspberry fruit differentiation using the Agilent CE 2100 Bioanalyzer. Agilent Technologies application note.**” 2008, Disponível em: < <https://cp.chem.agilent.com/Library/applications/5990-3327EN.pdf>>. Acesso em 10 mar, 2011.

BURRELL, A.; FOY, C.; BURNS, M. Applicability of Three Alternative Instruments for Food Authenticity Analysis: GMO Identification. **Biotechnol Res Int**, 2011.

CAPPARELLI, R.; COSTABILE, A.; VISCARDI, M.; VENTIMIGLIA, I.; LONGOBARDI, L.; FENIZIA, D.; IANNELLI, D. Quantification of Gliadin by Flow Cytometry. **Cereal Chemistry**, v. 81, n.4, p. 456-458, 2004

CATASSI, C. et al. A prospective, double-blind placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.85, n.1, p.160-166, 2007.

CELIAC SPRUE ASSOCIATION. **Defining "Gluten-Free"**. Omaha, 2011. Disponível em: <<http://www.csaceliacs.org/DefofGlutenFree.php>> Acesso em: 28 mai, 2011.

CICLITIRA, P. J. et al. The pathogenesis of coeliac disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 421- 458, 2005.

CICLITIRA, P. J.; MOODIE, S. J. Coeliac disease. **Best Practice e Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 2, p. 181–195, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2008) **CODEX STAN 118–1979**: Codex Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten, revised 2008.

DAHINDEN, I.; VON BÜREN, M.; LÜTHY, J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. **Eur Food Res Technol**, v. 212, p. 228–233, 2001.

DAHINDEN, I.; STADLER, M.; LÜTHY, J. Evaluation of a real-time PCR to detect coeliac-toxic components and comparison to the ELISA method analysing 35 baby food samples.

Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, v. 91, n. 6, p. 723-732, 2000.

DAVIDSON, L. S. P.; FOUNTAIN, J. R. Incidence of sprue syndrome with some observation on natural history. **British Medical Journal**, v. 1, n. 4663, p. 1157-1161, 1950.

DA-WEN, S. **Modern techniques for food authentication**. Amsterdam: Elsevier, p. 720, 2008.

DEWAR, D. H.; AMATO, M.; ELLIS, H. J.; POLLOCK, E. L.; GONZALEZ-CINCA, N.; WIESER, H.; CICLITIRA, P..J. The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with celiac disease. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 5, p. 483-491, 2006.

DEWAR, D. H.; CICLITIRA, P. J. Clinical Features and Diagnosis of Celiac Disease. **Gastroenterology**, v.128, n. 4, p.19-24, 2005.

DICKE, W.K., WEIJERS, H.A., VAN DE KAMER, J.H. Coeliac disease II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. **Acta Paediatr**, v.42, p.34-42, 1953.

DUPONT, F.M., CHAN R., LOPEZ R., VENSEL W. H. Sequential extraction and quantitative recovery of gliadins, glutenins, and other proteins from small samples of wheat flour. **J Agric Food Chem**, v. 53, n.5, p. 1575-1584, 2005.

ERLICH, H.A. **PCR: technology: principles and applications for DNA amplification**. New York/Oxford: Oxford University Press. 1992.

FARO, H.C. **Doença Celíaca**: revisão bibliográfica. Monografia (Especialização). Programa de Residência Médica em Pediatria. Hospital Regional da Asa Sul. Especialização em Pediatria, Brasília, 2008.

FELINTO, V.T. **Análise da rotulagem quanto a presença de glúten em chocolates**. Monografia (Especialização). Centro de Excelência em Turismo- CET. Universidade Federal de Brasília. Especialização em Gastronomia e Saúde, Brasília, 2008.

FOOD STANDARDS AGENCY. **Research and Survey Programmes**: Annual Report 2007. FSA/1194/0907, 2007. Disponível em : <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/researchreport2007.pdf>> Acesso em: 15 out, 2010.

GANDOLFI, L. et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. **American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 3, p. 689-692, 2000.

GARCIA, E. et al. Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 5, p. 529-539, 2005.

GEE, S. "On the Coeliac Affection", "Rheumatic Fever without Arthritis", in **St Bartholomew's Hospital Report** v. 24, p.17-20, 21-23, 1888.

GELINAS, P.; McKINNON, C.M.; MENDEZ, E. Gluten contamination of cereal foods in Canada. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 43, n.7. p. 1245-1252, 2008.

GRODZINSKY, E. et al. High prevalence of celiac disease in healthy adults revealed by antigliadin antibodies. **Annals of Allergy**, v. 69, n. 1, p. 66-70, 1992.

HENTERICH, N. et al. Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. **Nahrung**, v. 7, n.5, p. 345-348, 2003

HERNANDEZ, M.; ESTEVE, T.; PLA, M. Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Assays for Quantitative Detection of Barley, Rice, Sunflower, and Wheat. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.7003–7009, 2005.

HERNANDO, A.; VALDES, I.; MENDEZ, E. New strategy for the determination of gliadins in maize- or rice-based foods matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: fractionation of gliadins from maize or rice prolamins by acidic treatment. **J Mass Spectrom**, v. 38, n.8, p. 862-871, 2003.

HOULSTON, R. S.; FORD, D. Genetics of celiac disease. **The Quartely Journal of Medicine**, v. 89, n. 10, p. 737-743, 1996.

KALAYCI, A. G. et al. Bone mineral density and importance of a gluten-free diet in patients with celiac disease in childhood. **Pediatrics**, v. 108, n. 5, p. 89-93, 2001.

KING, A.L.; CICLIARA, P.J. Celiac disease: strongly heritable, oligogenic, but genetically complex. **Mol Genet Metab**, v. 71, p. 70-75, 2000.

KODA, Y.K.; BARBIERI, D. Doença celíaca. Estudo clínico em 27 crianças: problemas no retardo diagnóstico. **Pediatria (São Paulo)**, v.5, p. 38-41, 1983.

KOH, M. C.; LIM, C. H.; CHUA, S. B.; CHEW, S. T.; PHANG, S. T. W. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat species. **Meat Science**, v. 48, p. 275–285, 1998.

KÖPPEL, E.; MARKUS, S.; JÜRIG, L.; PHILIPP, H. Detection of wheat contamination in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Z Lebensm Unters Forsch A**, v. 206, p. 399-403, 1998.

KOTZE, L.M.S. Doença Celíaca. In:____. **Condutas em Gastroenterologia**. Federação Brasileira de Gastroenterologia,. Rio de Janeiro: Revinter, Cap. 17, p. 177-97. 2004a.

_____. Doença Celíaca. In:____. **Aparelho Digestivo Clínica e Cirurgia**. 3. ed. São Paulo: Coelho, J. C. U. Atheneu, 2005. p. 703-724

_____. Gynaecological and obstetrical findings in Brazilian patients with celiac disease in relation to nutritional status and adherence to a gluten-free diet. **J Clin Gastroenterology**, 2004b.

KOTZE, L.M.S; NISHIHARA, R.M; UTIYAMA, S.R.R; PIOVEZAN, G.C.; KOTZE, L.R. Thyroid disorders in Brazilian patients with celiac disease. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, p.33-36, 2006.

KOTZE, L.M.S. et al. Antiendomysium antibodies in Brazilian patients with celiac disease and their firstdegree relatives. **Arq Gastroenterol**, v. 38, n.2 p.94-103, 2001.

_____. Anti-endomysial antibodies in relatives of Brazilian patients with celiac disease. IN: XI International Symposium on Coeliac Disease, Belfast, North Ireland. Abstract no. 56, 2004.

KOTZE, L.M.S; UTIYAMA, S.R.R; NISHIHARA, R.M MOCELIN, V.; CARVALHO, R. F.A.; ZENI, M. P. B; AMARANTE, H. M. S. Comparação dos anticorpos antireticulina e antiendomísio classe IgA para diagnóstico e controle da dieta na doença celíaca. **Arq Gastroenterol**, 36:177-84. 1999.

LEFFLER, D. A. et al. Factors that influence adherence to a gluten-free diet in adults with celiac disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 53, p.1573-1581, 2008.

LOCKLEY, A.K. & BARDSLEY, R.G. DNA-based methods for food authentication. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 67–77, 2000.

MAFRA, I.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Food authentication by PCR-based methods. **Eur Food Res Technol**, v. 227, p. 649–665, 2008.

MANGUIN, S. et al. SCAR markers and multiplex PCR-based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 16, p. 46–54, 2002.

MELO, S. et al. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, state of São Paulo, Brazil. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 5, p. 1020-1025, 2006.

MÉNDEZ, E.; VELA, C.; IMMERS, U.; JANSSEN, F.W. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.17, n.10, p. 1053-63, 2005.

MEYER, R.; CANDRIAN, U. PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 29, p. 1-9, 1996.

NISHIHARA, R.M. et al. Celiac disease in children and adolescents with Down syndrome. **J Pediatr (Rio de Janeiro)**, v.81, p. 373-376, 2005.

NOT, T. et al. Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in health blood donors. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 33, n. 5, p. 494-498, 1998.

OGASAWARA, T. et al. A new class of enzyme acting on damaged ribosomes: ribosomal RNA apurinic site specific lyase found in wheat germ. **EMBO J.**, v.18, p. 6522- 6531, 1999.

OLEXOVA, L. et al. Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. **Food Control**, v.17, p. 234–237, 2006.

OLIVEIRA, R. P. et al. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. **European Journal of Gastroenterology e Hepatology**, v. 19, n. 1, p. 43-49, 2007.

OSMAN, A.A. et al. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.13, n.10, p.1189-93, 2001.

PEREIRA, M. A. G. et al. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 40, p. 6546-6550, 2006.

PITÉ, M. R. **Validação de um método alternativo de análise de glúten em géneros alimentícios, o ELISA-R5: comparação com o actual método oficial de análise.** Dissertação (Mestrado), Universidade de Lisboa. 2007.

POLANCO, I. Enfermedad celiaca. In: **Argüelles F & Polanco I. Manual de Gastroenterología Pediátrica**, Granada: Copart graf., 1996p. 261-268.

POPPING, B. The application of biotechnological methods in authenticity testing. **Journal of Biotechnology**, v. 98, 2002, p. 107–112.

PRATESI, R.; GANDOLFI, L. Doença celíaca: a afecção com múltiplas faces. **Jornal de**

Pediatrics, v. 81, n. 5, p. 357-358, 2005.

RAUEN, M. S.; BACK, J. C. V.; MOREIRA, E. A. M. Doença celíaca: sua relação com a saúde bucal. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 2, 2005.

RODRIGUES, A.F.; JENKINS, H.R. Coeliac disease in children. **Current pediatrics**, v. 16, p.317-321. 2006

ROSTAMI, K.; MULDER, C. J. J.; WERRE, J. M.; VAN BEUKELLEN, F. R.; KERCKHAERT, J.; CRUSIUS, J. B. A.; PEÑA, A. S.; WILLEKENS, F. L. A.; MEIJER, J. W. R. High prevalence of celiac disease in apparently healthy blood donors suggest a high prevalence of undiagnosed celiac disease in Dutch population. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 34, n. 3, p. 276- 279, 1999.

SAEZ, R.; SANZ, Y.; TOLDRA, F. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. **Meat Science**, v. 66, p. 659–665, 2004.

SANDBERG, M.; LUNDBERG, L.; FERM, M.; YMAM, I.M. Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 344–349, 2003.

SCHUPPAN, D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 119, n. 1, p. 234-242, 2000.

SDEPANIAN, V.L.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Doença Celíaca: avaliação da obediência à dieta isenta de glúten e do conhecimento da doença pelos pacientes cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil (ACELBRA). **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n.4. São Paulo- SP, 2001b

_____. Revisão - Doença Celíaca: a evolução dos conhecimentos desde sua centenária descrição original até os dias atuais. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 36, p. 244-258, 1999.

_____. Doença celíaca: características clínicas e métodos utilizados no diagnóstico de pacientes cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil. **Jornal de Pediatria. (Rio J.)**, Porto Alegre, v. 77, n.2, 2001a.

SDEPANIAN, V.L; SCALETSKY, I.C.; FAGUNDES-NETO, U.; BATISTA, D.M. Assessment of gliadin in supposedly gluten-free foods prepared and purchased by celiac patients. **J. Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.32, n. 1, p. 65-70, 2001c.

SHAHBAZKHANI, B.; MALEKZADEH, R.; SOTOUDEH, M.; MOGHADAM, K. F. High prevalence of celiac disease in apparently healthy Iranian blood donors. **European Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 5, p. 475-478, 2003.

SHAMIR, R.; LERNER, A.; SHINAR, E.; LAHAT, N.; SOBEL, E.; BAR-OR, R.; KERNER, H.; ELIAKIM, R. The use of a single serological marker underestimates the prevalence of celiac disease in Israel: A study of blood donors. **American Journal of Gastroenterology**, v. 97, n. 10, p. 2589-2594, 2002.

SHAN, L.; MOLBERG, O.; PARROT, I.; HAUSCH, F.; FILIZ, F.; GRAY, G.M.; SOLLID, L.M.; KHOSLA, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, p. 2275–2279, 2002.

SHIDRAWI, R.G.; DAY, P.; PRZEMIOSLO, R.; ELLIS, H.J.; NELUFER, J.M.; CICLITIRA, P.J. In vitro toxicity of gluten peptides in coeliac disease assessed by organ culture. **Scand J Gastroenterol**, v.30, n.8, p.758-763, 1995.

SILVA, R.P. **Detecção e quantificação de glúten em alimentos industrializados por técnica de ELISA**. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. Mestrado em Ciências, São Paulo, 2010.

SILVA, T. S. G.; FURLANETTO, T. W. Diagnóstico de doença celíaca em adultos. **Rev. Assoc. Med. Bras.** [online], v.56, n.1, p. 122-126, 2010.

SKERRITT, J.H.; HILL, A.S. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. **J Assoc Off Anal Chem**, v. 74, n. 2, p. 257-264, 1991.

STORSRUD, S.; YMAN, I.M.; LENNER, R.A. Gluten contamination in oat products and products naturally free from gluten. **European Food Research and Technology**, v.217, n. 6, p.481-485, 2003.

TAVOLETTI, S.; IOMMARINI, L.; PASQUINI M. A DNA method for qualitative identification of plant raw materials in feedstuff. **Eur Food Res Technol**, v. 22, p. 475-484, 2009.

TERZI, V.; MORCIA, C.; GORRINIA, A.; STANCA, A.M.; SHEWRY, P.R.; FACCIOLI, P. Review - DNA-based methods for identification and quantification of small grain cereal mixtures and fingerprinting of varieties. **Journal of Cereal Science**, v. 41, p. 213-220, 2005.

THERON, J.; CLOETE, T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 26, p. 37-57, 2000.

THOMPSON, T. Do oats belong in a gluten-free diet? **Journal American Dietetic Association**, v. 97, p. 1413-1416, 1997.

TREVISIOL, C.; NOT, T.; BERTI, I.; BURATTI, E.; CITTÀ, A.; NERI, E.; TORRE, G.; Screening for celiac disease in healthy blood donors at two immuno-transfusion centers in northeast Italy. **Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 31, n. 7, p. 584-586, 1999.

USAI, P.; CUOMO, R.; LAI, M.A; BOI, M.F. Effect of glúten free diet and co- morbidity of irritable bowel syndrome-type symptoms on health-related quality of life in adult coeliac patients. **Digestive and Liver disease**, v. 39, p. 824- 828, 2007.

UTIYAMA, S.R.R; KOTZE, L.M.S; NISIHARA, R.N; et al. Correlação dos anticorpos antiendomísio e antitransglutaminase com a doença celíaca. **RBAC**, v.34, p.399- 445, 2002.

VALDÉS, I.; GARCIA, E.; LLORENTE, M.; MENDEZ, E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. **European Journal of Gastroenterol Hepatology**, v. 15, n. 7, p. 465-74, 2003.

WALKER-SMITH, J.; MURCH, S. Coeliac disease. In: **Diseases of the small intestine in childhood**, 4º ed. Oxford: Isis Medical Media Ltd., 1999.

WOOLFE, M.; PRIMROSE, S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 222-226, 2004.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3-4, p. 215-230, 2001.

ZELTNER, D.; GLOMB, M.A.; MAEDE, D. Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. **European Food Research and Technology**, v.228, p. 321–330, 2009.

ANEXO A – SOLUÇÕES CTAB

- Tampão CTAB (20g CTAB/L, 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris HCL, 20mM EDTA)

Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB)-----	2.0g
Tris (hidroximetil) aminometano/ HCl 1M pH 8,0-----	10mL
NaCl 3M pH 8.0-----	46.6ml
Ácido etilenodiamino tetra- acético 0.5M-----	4.0ml
Água purificada qsp-----	100ml

- Solução de Tris/HCl 1M

Tris (hidroximetil) aminometano-----	121.14g
Água purificada qsp-----	1000ml

Adicionar 600ml de água purificada, dissolver com agitação, ajustar o pH a 8.0 com ácido clorídrico e completar o volume até 1000ml.

- Tampão de precipitação com CTAB (5g CTAB/L; 0.04M NaCl)

Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB)-----	0.5g
NaCl 3M pH 8.0-----	1.33ml
Água purificada qsp-----	100ml

- Solução de NaCl 1.2M

Cloreto de sódio-----	70.13g
Água purificada qsp-----	1000ml

Adicionar 800ml de água purificada, dissolver o sal e completar o volume até 1000ml.

- Solução de NaCl 3M

Cloreto de sódio-----	175.32g
Água purificada qsp-----	1000ml

Adicionar 800ml de água purificada, dissolver o sal e completar o volume até 1000ml.

- Solução de EDTA 0.5M

Ácido etilenodiamino tetra- acético (PM 292.2)----- 186.1g
 Água purificada qsp----- 1000ml

Adicionar 800ml de água purificada, dissolver com agitação, ajustar o pH a 8,0 com hidróxido de sódio e completar o volume até 1000ml.

- Tampão TBE 5X

Tris (hidroximetil) aminometano----- 54.0g
 Ácido bórico----- 27.5g
 Ácido etilenodiamino tetra- acético 0.5M pH8.0----- 20ml
 Água purificada qsp----- 1000ml
 Ajustar o pH 8.0 com ácido clorídrico.

- Tampão TBE 1X (100Mm Tris HCl, 90mM ácido bórico, 1mM EDTA)

Tampão TBE 5X----- 200ml
 Água purificada qsp----- 1000ml

- Solução de Brometo de etídio(5mg/ml)

Brometo de etídio----- 0.005g
 Água purificada qsp----- 1ml

ANEXO B – FOTOS GÉIS PCR

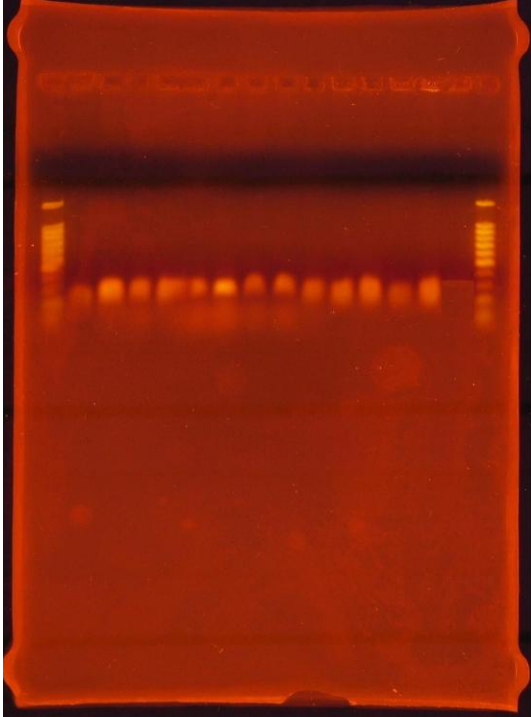
- Géis Trigo

Figura 9: Gel PCR Trigo amostras 1-12

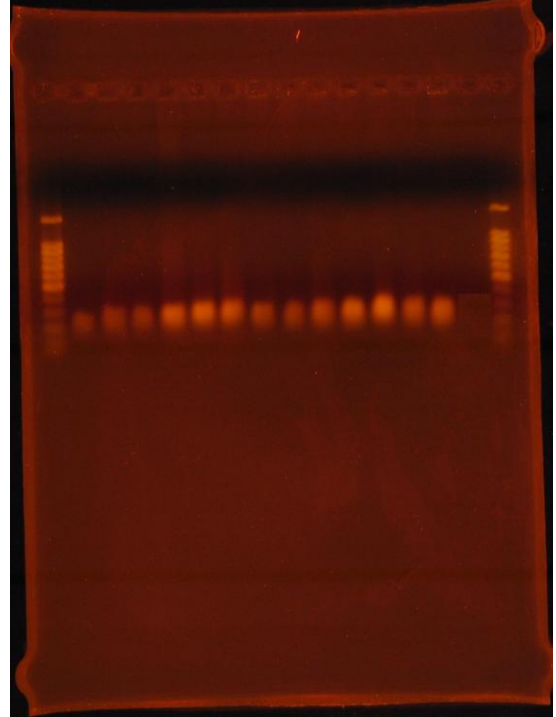


Figura 10: Gel PCR Trigo amostras 13-24

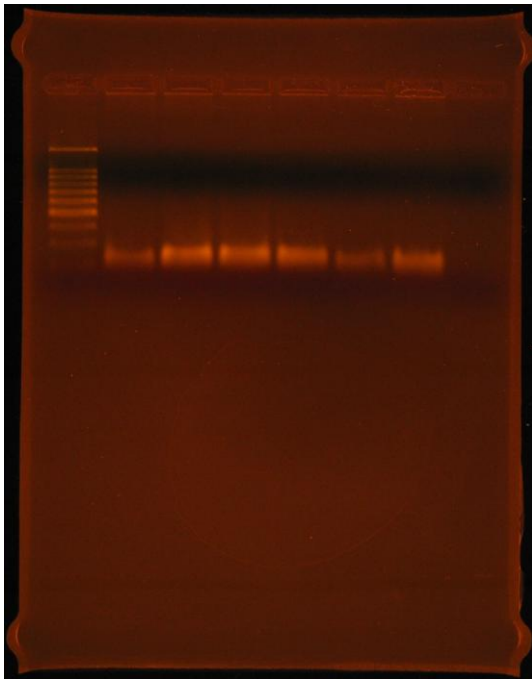


Figura 11: Gel PCR Trigo amostras 16-20

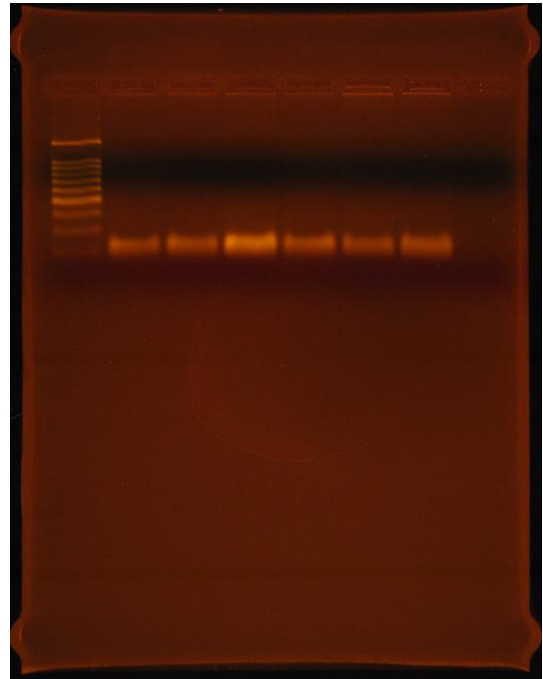


Figura 12: Gel PCR Trigo amostras 21-25

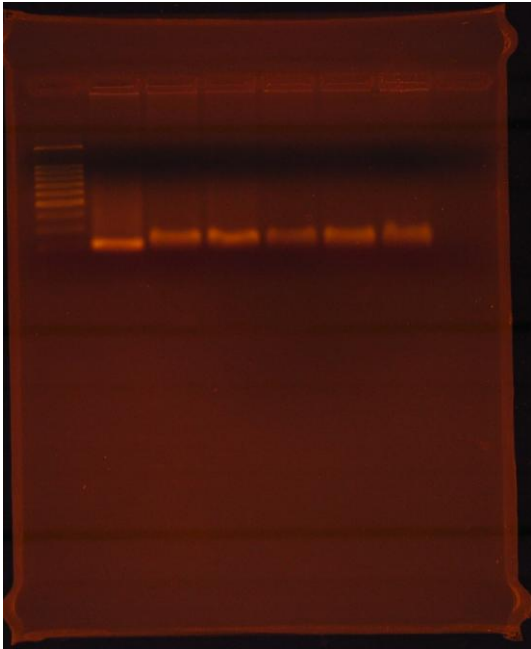


Figura 13: Gel PCR Trigo amostras 26-30

- Géis Centeio

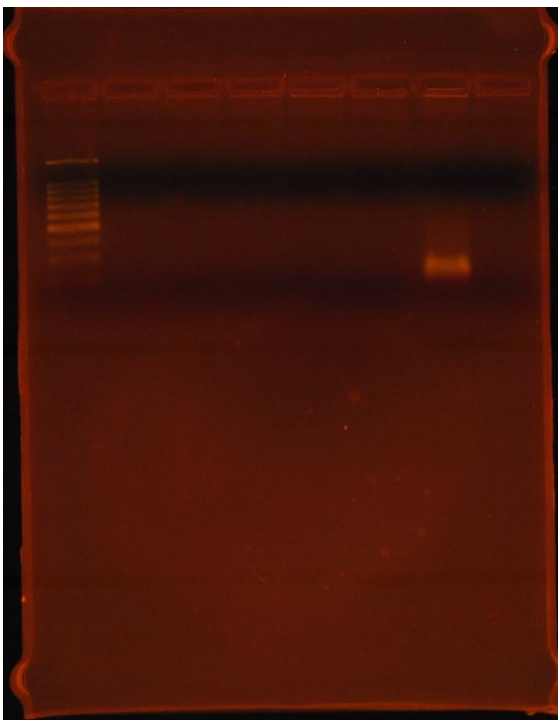


Figura 14: Gel PCR Centeio amostras 1-5

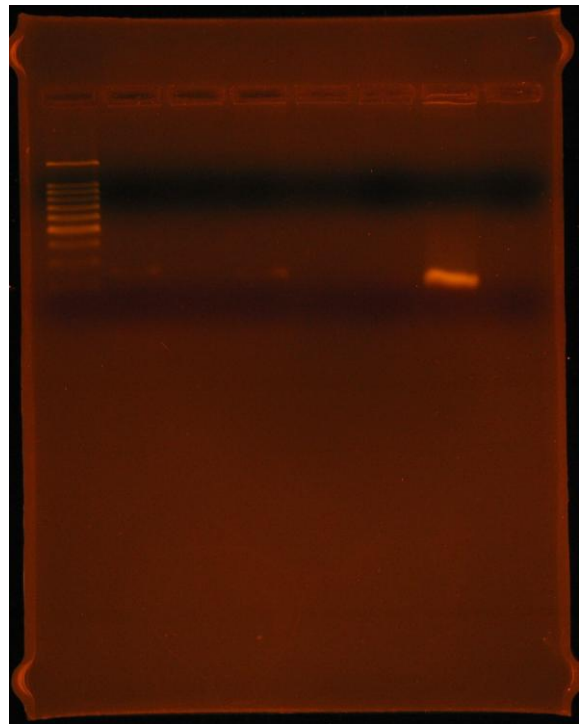


Figura 15: Gel PCR Centeio amostras 6-10

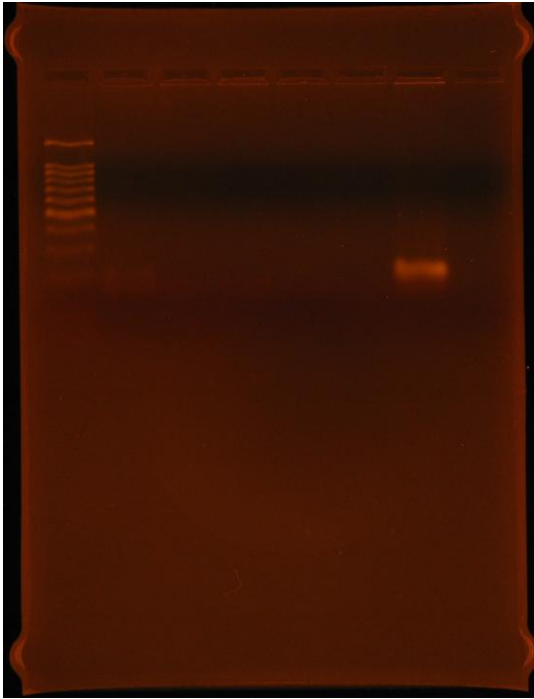


Figura 16: Gel PCR Centeio amostras 11-15

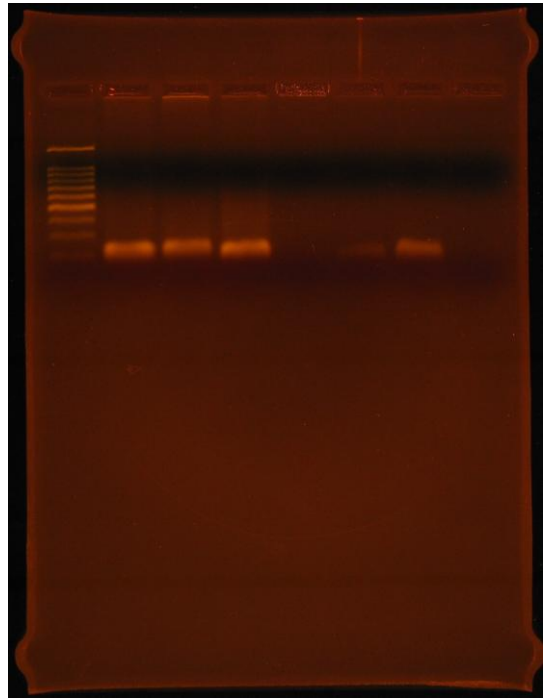


Figura 17: Gel PCR Centeio amostras 16-20

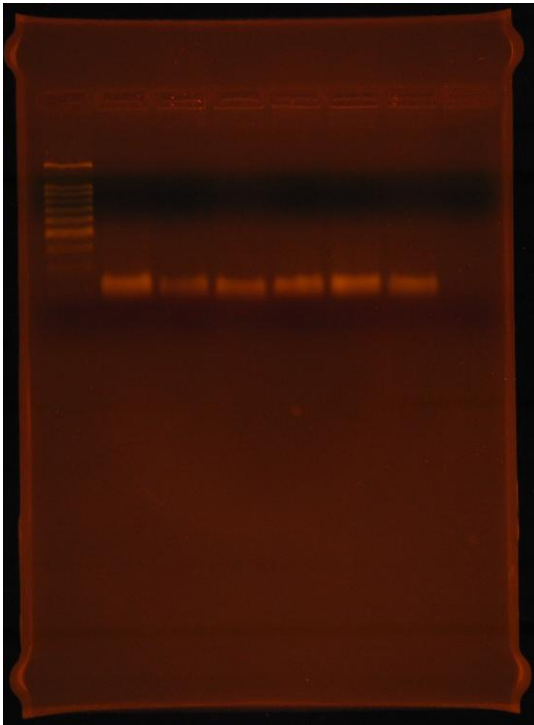


Figura 18: Gel PCR Centeio amostras 21-25

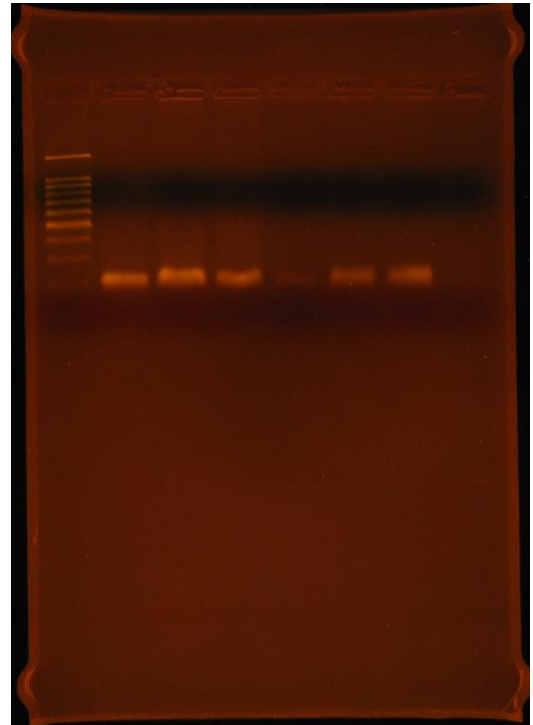


Figura 19: Gel PCR Centeio amostras 26-30

2.3- Géis Cevada

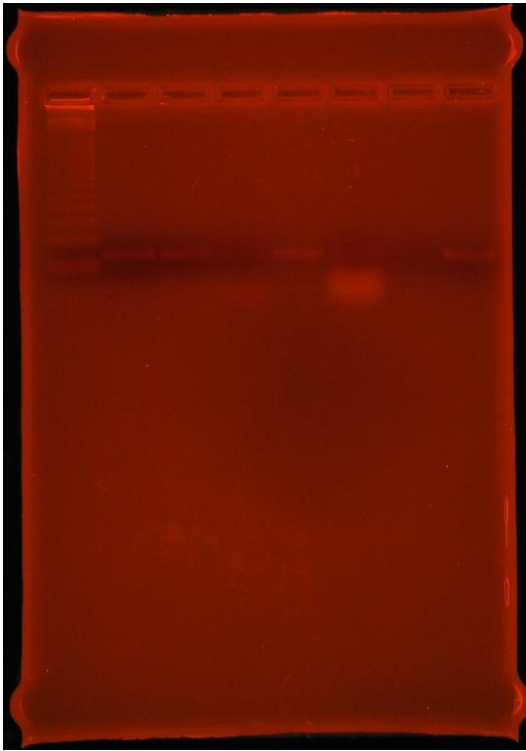


Figura 20: Gel PCR Cevada amostras 1-5

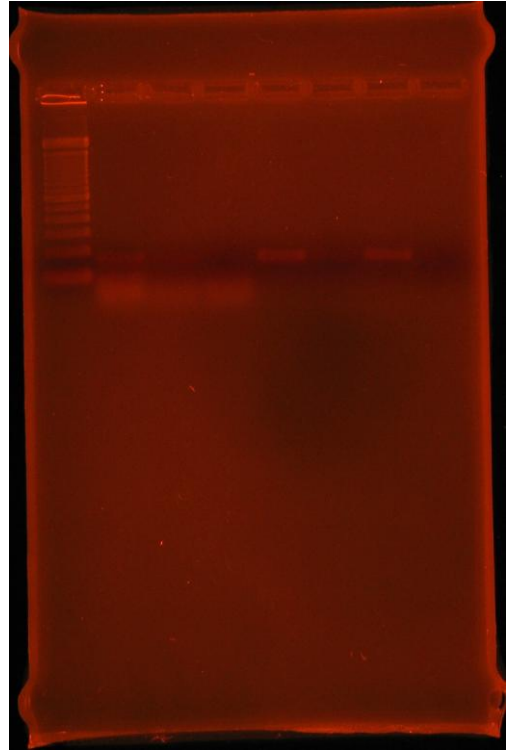


Figura 21: Gel PCR Cevada amostras 6-10

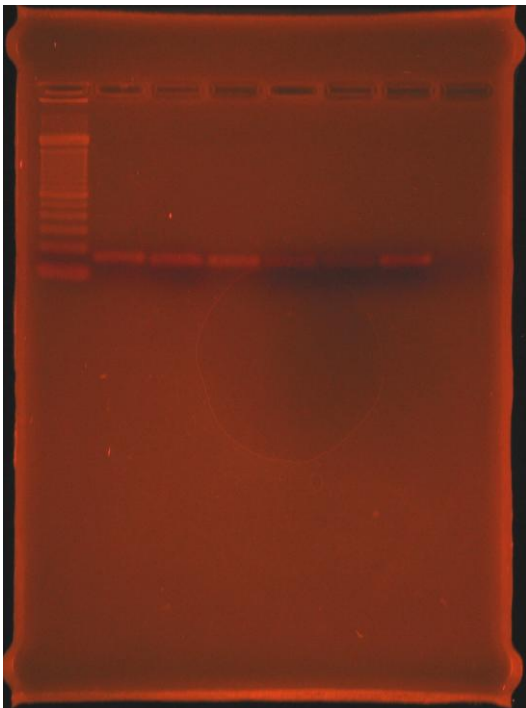


Figura 22: Gel PCR Cevada amostras 11-15

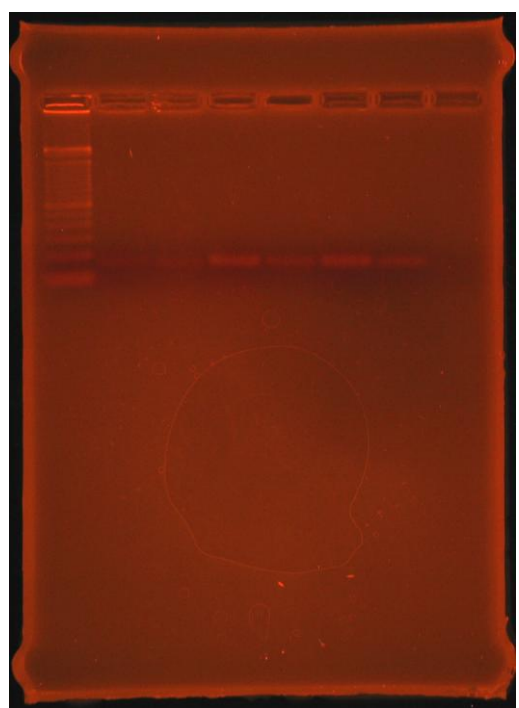


Figura 23: Gel PCR Cevada amostras 16-20

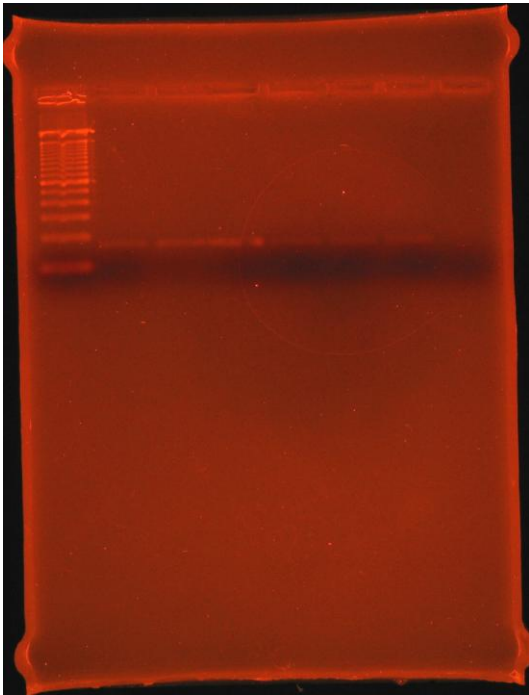


Figura 24: Gel PCR Cevada amostras 21-25

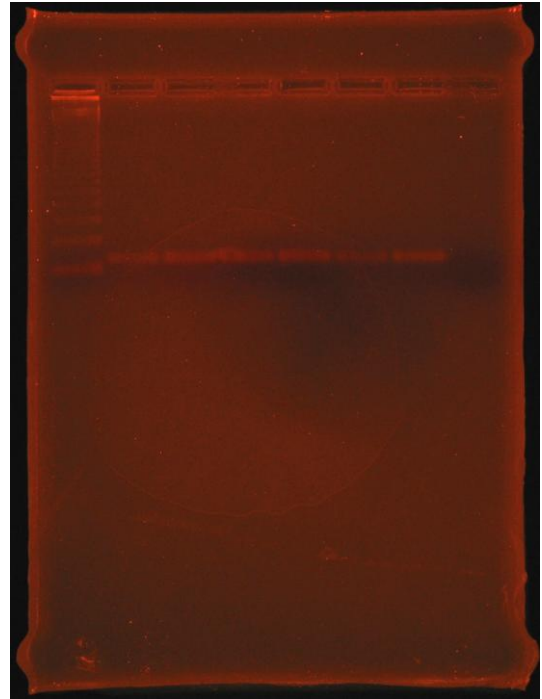


Figura 25: Gel PCR Cevada amostras 26-30

2.3- Géis Aveia

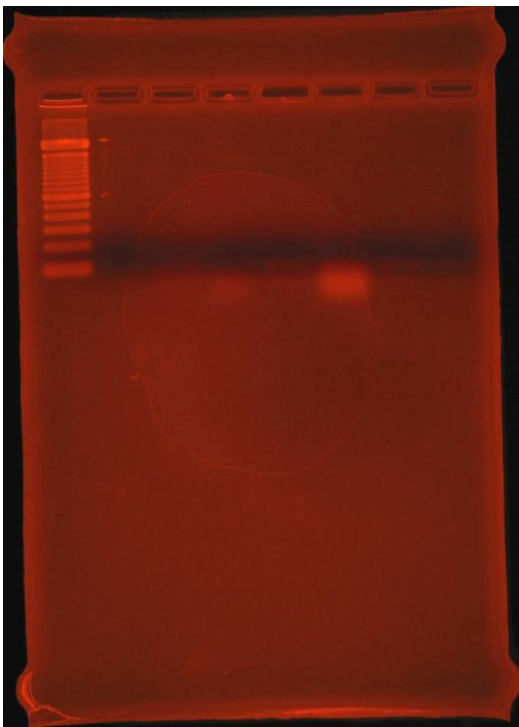


Figura 26: Gel PCR Aveia amostras 1-5

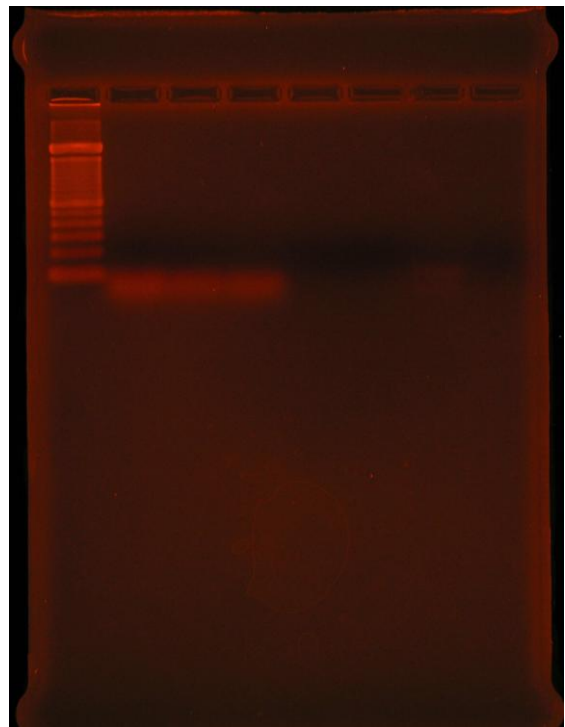


Figura 27: Gel PCR Aveia amostras 6-10



Figura 28: Gel PCR Aveia amostras 11-15

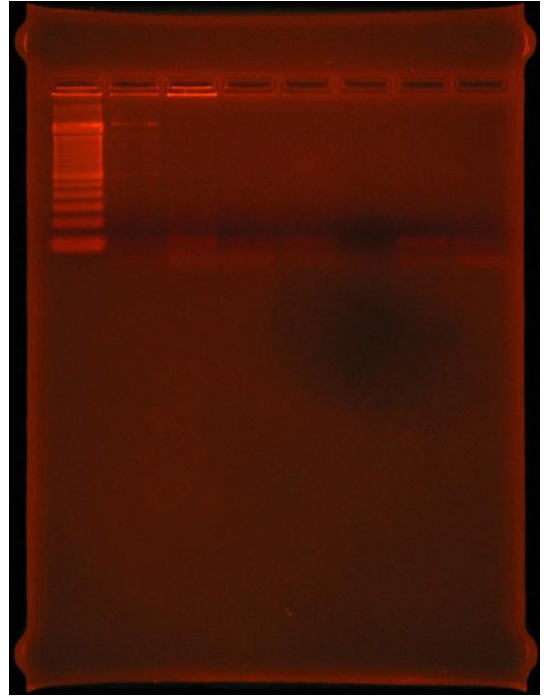


Figura 29: Gel PCR Aveia amostras 16-20

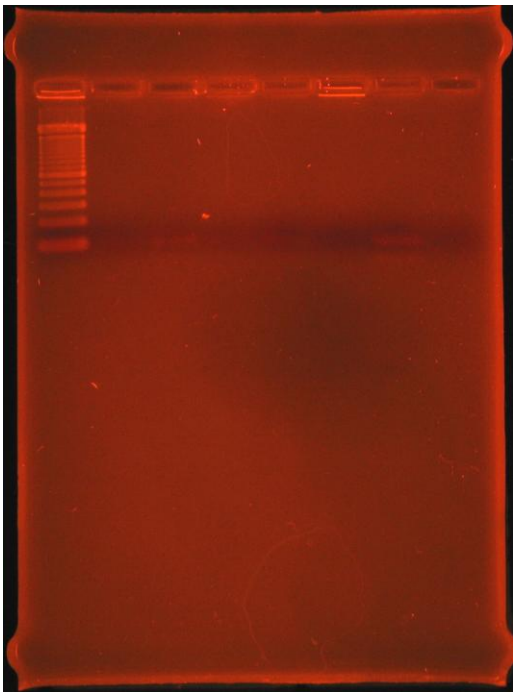


Figura 30: Gel PCR Aveia amostras 21-25

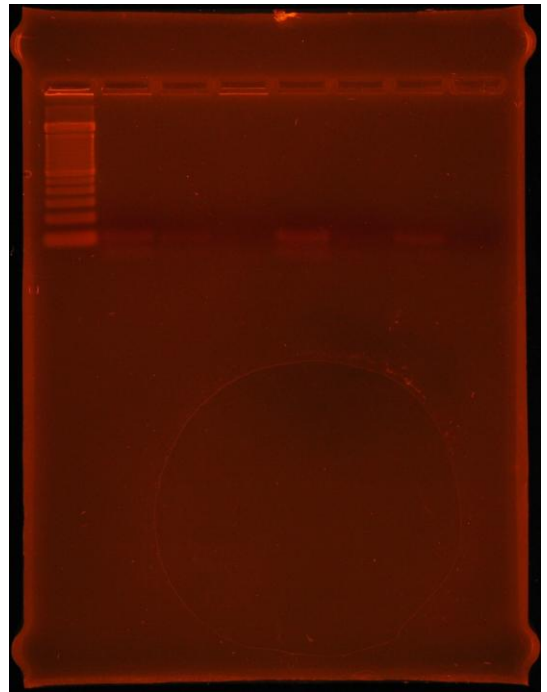


Figura 31: Gel PCR Aveia amostras 26-30