

Proposta de método de triagem por microscopia na pesquisa de amido em alimentos industrializados rotulados como “não contém glúten e contém glúten”.

Autores:
Juliana Machado dos SANTOS^{1*}
Bruna Amatto Duarte PIRES²
Victor Augustus MARIN³
Bruna Kely Barbosa GODOI¹
Robson Alves LUIZ¹
Christina Maria Queiroz de Jesus MORAIS¹
Paola Cardarelli LEITE⁴

1. Núcleo de Alimentos, Microscopia e Métodos Rápidos, Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz.

2. Aluna de Doutorado em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz.

3. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

4. Laboratório de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz.

*Endereço para correspondência: Núcleo de Alimentos, Microscopia e Métodos Rápidos, Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365 - Rio de Janeiro - RJ, Brasil. Tel.: 21 3865-5242.
E-mail: juliana.santos@incqs.fiocruz.br

Imagem Ilustrativa



Resumo

A doença celíaca (DC) é reconhecida como doença autoimune, causada pela intolerância permanente às proteínas contidas no glúten e que se expressa por linfócitos T, em indivíduos geneticamente predispostos. Caracteriza-se por atrofia total ou subtotal das vilosidades do intestino delgado proximal, causando a má absorção da grande maioria dos nutrientes. O tratamento da DC consiste na dieta isenta de glúten de forma permanente.

A proposta deste trabalho foi obter

um método de triagem por microscopia na pesquisa de amidos em amostras de alimentos industrializados descritos em seus rótulos como não contém glúten e contém glúten para diminuir o processamento de um grande número de amostras na análise quantitativa.

Estas amostras foram previamente avaliadas, quanto à presença de glúten, pelo método imunoenzimático (ELISA) e pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) e posteriormente avaliadas quanto à presença de amido pelo método

microscópio ótico. Os resultados de cada método das amostras foram correlacionados com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do método de microscopia.

A microscopia apresentou boa concordância com os métodos ELISA e PCR na detecção de trigo, confirmando sua relevância para este propósito. É um método confiável e sensível podendo ser empregado como método de triagem.

Palavras-chave: Microscopia, amido, método de triagem, glúten.

Abstract

Celiac disease (CD) is recognized as autoimmune disease, caused by permanent intolerance to proteins contained in gluten and which is expressed by T lymphocytes in genetically predisposed individuals. It characterized by total or subtotal villous atrophy of the proximal small intestine, leading to poor absorption of most nutrients. Treatment of DC consists in the gluten-free diet permanently.

The purpose of this study was to obtain a method of screening for microscopy research on starches in industrial food samples as described on their labels do not contain gluten and gluten-free to decrease the processing of a large number of samples for quantitative analysis.

These samples were previously evaluated for the presence of gluten by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the polymerase chain reaction method (PCR) and subsequently evaluated for the presence of starch by optical microscopy method. The results of each method were correlated with the samples to evaluate the reproducibility of the microscopy method.

Microscopy showed good agreement with the ELISA and PCR methods in wheat detection, confirming its relevance for this purpose. It is a reliable and sensitive method can be used as a screening method.

Keywords: *Microscopy; Starch; Screening Method; Gluten*

Introdução

A doença celíaca (DC) é reconhecida como uma doença autoimune, causada pela intolerância permanente às proteínas contidas no glúten presente em alguns cereais, como o trigo, o centeio, a cevada e a aveia e que se expressa por enteropatia mediada por linfócitos T, em indivíduos geneticamente predispostos. Caracteriza-se por atrofia total ou subtotal das vilosidades do

intestino delgado proximal, levando conseqüentemente, à má absorção da grande maioria dos nutrientes¹ (PENNA, 1991).

O tratamento da DC consiste na dieta isenta de glúten de forma permanente^{2,3,4} (POLANCO, 1996; SDEPANIAN, 2001; ROESSLER, 2001).

O paciente celíaco deve estar atento também à composição dos medicamentos prescritos para ele³ (SDEPANIAN, 2001).

Estudos realizados, principalmente na Europa e nos Estados Unidos, indicam que a DC ocorre em torno de 0,5% a 1% da população geral^{5,6} (DUBÉ, 2005; FASANO, 2003).

No Brasil, a prevalência de doença celíaca é estimada em 0,14% (1:687) na região centro-oeste e 0,1% (1:1.000) na região sul^{7,8} (GANDOLFI, 2000; NISHIHARA RM, KOTZE LM, MOCELIN V et al, 2005).

O glúten corresponde à fração proteica dos grãos do trigo, centeio, cevada e aveia⁹ (WIESER, 2007) e, conseqüentemente, em todos os alimentos derivados e fabricados com estes cereais. As prolaminas são responsáveis pela toxicidade do glúten para pacientes celíacos¹⁰ (VADER, STEPNIAK, BUNNIK, et al., 2003). A prolamina de trigo é a gliadina, a de centeio é a secalina, a de cevada é a hordeína e a de aveia é a avenina⁹ (WIESER, 2007), embora haja discussão que a aveia devido ao seu baixo conteúdo de prolaminas pode ser considerada como não contém glúten, mas o CODEX Alimentarius considera o cereal como contém glúten e a RDC nº 26, de 02 de julho de 2015 que dispõe sobre alimentos que causam alergias alimentares além de trigo, centeio, cevada inclui aveia e suas estirpes hibridizadas como alergênicos^{11,12}.

O grão de trigo tem sua estrutura dividida em três partes, como

em outros cereais: pericarpo, o endosperma e o germe, e possui diversos nutrientes como amido, fibras e proteínas. O endosperma é onde está concentrada a maior parte das proteínas do cereal, e também o amido, que é a porção utilizada para a fabricação de farinha^{13,14,15}

(POMERANZ, 1987; CORNELL, 2003; TOSI et al, 2011). O endosperma é uma camada formada por um tecido de células poligonais, irregulares, contendo grãos de amido e glúten¹⁶ (BEUX, 1997).

O glúten se encontra combinado com o amido em alguns dos cereais que o contém. O glúten seco contém em torno de 75-80% de proteína, 10-15% de amido e aproximadamente 5% de gordura¹⁷ (FLINT, 1996).

O amido faz parte da composição de diversos alimentos como arroz, milho, fécula de mandioca, fécula de batata, fécula de batata-doce. Inclusive os que contém glúten como trigo, aveia, centeio e cevada¹⁸ (GUTIÉRREZ et al, 2004).

O amido é fonte de carboidratos, obtido de diversas fontes vegetais e representa 70 a 80% da composição dos grânulos de cereais e está presente nas raízes e nos tubérculos, e também de frutas e legumes, no entanto, a extração comercial de amido se restringe aos cereais, raízes e tubérculos. O amido é um polissacarídeo formado por dois tipos de polímeros de glicose: a amilose e a amilopectina, com estruturas funcionais diferentes^{19,20} (FRENCH, 1973; GUILBOT, MERCIER, 1985).

No interior dos aminoplastos, onde são produzidos os amidos, a amilose e amilopectina são sintetizados dando lugar a formação de grânulos de amido que apresentam um certo grau de organização molecular, o que confere aos mesmos um caráter parcialmente cristalino,



Autores:
Juliana Machado dos SANTOS^{1*}
Bruna Amatto Duarte PIRES²
Victor Augustus MARIN³
Bruna Kely Barbosa GODOI¹
Robson Alves LUIZ¹
Christina Maria Queiroz de Jesus MORAIS¹
Paola Cardarelli LEITE⁴

ou semicristalino²¹ (YOUNG, 1984). As camadas cristalinas e semi-cristalinas se superpõem ao redor de um ponto que é denominado "hilo ou hilum"²²(KOSSMAMN, LLOYD, 2000), considerado o ponto original de crescimento do grânulo, onde se inicia o processo de deposição de amido no aminoplasto²³ (DERNARDIN, SILVA, 2009), podendo não ser vista em alguns grânulos de amido. Pelo caráter cristalino ou semicristalino, os grânulos de amido apresentam a birrefringência quando observados em microscópio óptico sob luz polarizada²⁴ (SOUZA, ANDRADE, 2000). Além das diferenças na estrutura granular, têm-se as diferenças nas propriedades físico-químicas e na qualidade dos produtos finais²⁵(VAN HUNG; MAEDA; MORITA, 2006).

Os amidos apresentam-se como pós finos de coloração esbranquiçada. É encontrado na maioria dos alimentos sendo responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados²⁶ (GALLANT,1992).

Para uma diagnose do amido e féculas em exame microscópico óptico, devem-se observar a forma, o tamanho, o hilo, as estrias presentes ou não, os agrupamentos e as cruzes polarização. As camadas aliadas ao tamanho e a forma dos grânulos, podem servir de meio de identificação microscópica da origem botânica

do amido¹⁶ (BEUX, 1997).

O amido possui ampla utilização em diversos setores, sendo uma de suas principais áreas de aplicação a indústria alimentícia como ingrediente em alimentos processados²⁵ (VAN HUNG; MAEDA; MORITA, 2006).

Um dos objetivos na análise microscópica de um produto alimentício é a identificação dos elementos histológicos característico do produto²⁷(RODRIGUES, et al,1999) . A análise histológica visa garantir ao consumidor adquirir produtos que contenham os ingredientes declarados no rótulo, permitindo constatar a autenticidade do produto.

Na análise de alimentos, a microscopia constitui um método rápido, eficiente nas identificações desejadas, fornecendo laudo diagnóstico conclusivo em análises bromatológicas e excelente ferramenta para auxiliar na análise laboratorial proporcionando uma informação que complementa a fornecida pelas análises físicos e química¹⁷ (FLINT, 1996).

A microscopia é uma análise de baixo custo frente às técnicas imunoenzimáticas e moleculares, contribuindo para a vigilância sanitária no programa de monitoramento de produtos que declarados em seu rótulo "contém ou não contém glúten" e sendo uma técnica mais acessível podendo ser utilizada na triagem de amostras quando comparada às análises mais sofisticadas.

Podemos considerar evidências

de risco: a alta prevalência da doença celíaca pela ingestão do glúten a pacientes suscetíveis; a pouca diversidade de alimentos sem glúten por possíveis contaminações cruzadas, gerando imprecisas informações nas rotulagens de alimentos para os celíacos. Assim, faz-se necessária a busca de conhecimentos científicos sobre novas alternativas metodologias que possam contribuir nas ações de saúde pública através da vigilância sanitária, como utilizar a identificação de amidos através da microscopia, como meio de comprovação da autenticidade de um produto em relação à lista de ingredientes contida em seu rótulo, contribuindo para a prevenção e promoção da saúde dos celíacos.

A proposta deste trabalho foi obter um método de triagem por microscopia na pesquisa de amidos em amostras de alimentos industrializados descritos em seus rótulos como não contém glúten e contém glúten para diminuir o processamento de um grande número de amostras na análise quantitativa.

As amostras de alimentos industrializados, utilizados neste trabalho, foram previamente avaliadas, quanto à presença de glúten, pelo método imunoenzimático (ELISA) com padrão gliadina que identifica trigo e pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers para cevada, centeio, trigo e aveia por Pires²⁸ e Moraes e colaboradores ²⁹. Estes resultados foram comparados com o método microscópico óptico na identificação de amido correlacionando a presença de glúten ou não tendo como



LAS do Brasil



Linha completa de **equipamentos** e **reagentes** para **análise de água**

A LAS do Brasil possui um time técnico especializado que contribui no desenvolvimento de projetos para seu laboratório. Oferecemos experiências inovadoras com apresentações personalizadas, demonstrações e testes de uma completa gama de produtos que dinamizam e facilitam suas análises laboratoriais.



+55 62 **3085-1900**

lovibond@lasdobrasil.com.br | www.lasdobrasil.com.br
Consulte nosso time de especialistas.

Conheça algumas de nossas marcas





objetivo avaliar a reprodutibilidade do método.

Metodologia

Amostras

As 41 amostras de alimentos industrializados foram previamente analisadas pelo método ELISA (RIDASCREEN® Gliadin - R-Biopharm AG) e por PCR (com extração do DNA por ação do CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio). Destas, 30 são amostras de biscoitos previamente descritas e analisadas por ELISA e PCR cujos resultados foram obtidos na dissertação de Pires²⁸. As outras 11 amostras: batata frita, polvilho doce, creme de arroz, fécula de batata, farofa de soja, fubá de milho, farinha de milho fina, sopa de cebola, farinha de milho temperada, fubá e farinha de milho flocada, foram previamente analisadas pelo método de ELISA na detecção de glúten para avaliar a veracidade dos rótulos dos alimentos processados por Moraes e colaboradores²⁹ no Núcleo de Alimentos, Microscopia e Métodos Rápidos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

Estas mesmas amostras, inicialmente processadas e preparadas para as análises de glúten por ELISA e PCR, foram cedidas para o laboratório de Microscopia de Alimentos e analisadas com a técnica de microscopia ótica. Os resultados das análises estão descritos nos quadros 1 e 2.

Produção de fotomicrografias como material de referência.

Com o objetivo de registrar imagens e utilizá-las como material de referência na identificação das características morfológicas dos diferentes amidos detectados por microscopia nas amostras estudadas, foram comprados grãos dos cereais trigo, centeio, cevada, aveia, arroz, milho e tubérculos como mandioca e batata, obtidos em estabelecimentos varejistas no município do Rio de Janeiro. Estes foram submetidos a três diferentes temperaturas, simulando o tratamento recebido pelas amostras: 2 a 8 ° C por 24h para armazenamento, temperatura ambiente (25 ± 2°C); e aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma, com o objetivo de auxiliar na comparação dos grânulos do amido alterados em suas características morfológicas como nos alimentos industrializados. Em seguida realizou-se a identificação do amido.

Identificação de amido

Para a identificação do amido²⁷ (RODRIGUES, et al,1999) por microscopia as amostras, os cereais e tubérculos foram triturados. De cada material individualmente, foi tomada uma alíquota de 3 g e adicionados 20 mL de água destilada e agitado com bastão de vidro. Foi retirada uma gota do material para a preparação da lâmina. Foi

Autores:
Juliana Machado dos SANTOS^{1*}
Bruna Amatto Duarte PIRES²
Victor Augustus MARIN³
Bruna Kely Barbosa GODOI¹
Robson Alves LUIZ¹
Christina Maria Queiroz de Jesus MORAIS¹
Paola Cardarelli LEITE⁴

utilizado uma gota de lugol (Iodo p.a. 1g, Iodeto de potássio p.a. 2 g, água destilada q.s.p. 200 mL) como corante, quando necessário.

Posteriormente cada material foi examinado ao microscópio óptico com e sem luz polarizada em aumentos de 100, 200 e 400X para identificação dos grânulos de amido, comparando-os com referências bibliográficas quando existentes. As amostras foram também comparadas com as fotomicrografias. A microscopia foi realizada utilizando um microscópio Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha), modelo Axioscopy. O procedimento para o preparo de amostra para a microscopia com luz polarizada foi o mesmo para a microscopia óptica, mas com adição de lugol diluído para visualizar o hilo e as camadas do grânulo, como se apresenta na figura 1(c).

Identificação do amido nas amostras

As amostras que continham teor de gorduras alto (biscoitos, sopa de cebola, farofa de soja e farinha de milho temperada) foram submetidas previamente a um tratamento com álcool (etílico ou isopropílico): éter, na proporção 1:1 (v/v) para remoção da gordura.

Na identificação de amido foi tomada uma alíquota de 3 g das amostras e identificou-se o amido como descrito anteriormente.

Comparação dos Métodos LISA, PCR e Microscopia

Para avaliar a concordância entre os resultados obtidos nos métodos ELISA, PCR e Microscopia foram utilizados os resultados

categoricos (positivo ou negativo) para a presença dos cereais trigo, cevada, centeio e aveia obtidos nas diferentes técnicas e a porcentagem de concordância entre os métodos, foi calculada e classificada como: Pobre (<0.00%), Leve (0-20) %, Razoável (21-40)%, Moderada (41-60)%, Substantial (61-80)% ou Quase Perfeita (81-100)%, como descrito por Landis e Koch 30.

Resultados e Discussão

Comparação das fotomicrografias produzidas como material de referência para identificação de amidos nas amostras

As fotomicrografias foram produzidas com o objetivo de registrar as imagens e utilizá-las como material de referência que permitiu identificar as características morfológicas dos diferentes amidos detectados por microscopia nas amostras estudadas. É comum nas áreas biológicas se utilizar das fotomicrografias como abordagem metodológica a captura de imagens de lâminas com o objetivo de estudar ou pelo simples fato de ilustrar, Santos utiliza a fotomicrografia para estudos taxonômicos de insetos³¹.

A imagem 1 ilustra as amostras sendo comparadas com as fotomicrografias, demonstrando as características de cada grânulo.

Na amostra 1 (a) declarada no rótulo pelo seu fabricante o ingrediente mandioca. Por meio da microscopia foi detectada a presença de grânulos de fécula de mandioca e amido de trigo. O grânulo da fécula de mandioca se apresenta na forma arredondada irregular, o hilo central, estrias pouco definidas e a cruz de malta bem marcada.

Na amostra 9 (b) declarada no rótulo pelo seu fabricante o ingrediente tortilhas de milho. Por meio da microscopia foi detectada a presença do grânulo do amido de milho

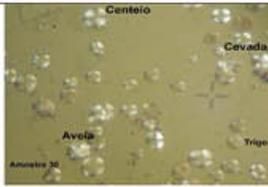
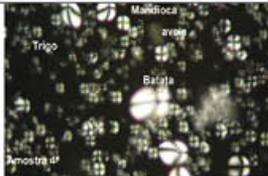
e trigo. O grânulo do amido de milho se apresenta de forma poliédrica, o hilo central, estrias definidas e a cruz de malta bem marcada.

Na amostra 30 (c) declarados no rótulo pelo fabricante os ingredientes farinha de trigo, farinha de trigo integral, aveia em flocos, farinha de centeio, farinha de cevada. Por meio da microscopia foi detectada a presença de amido centeio, cevada, aveia e trigo. O grânulo do amido de centeio se apresenta de forma arredondada, o hilo central radiado, estrias pouco definidas e a cruz de malta bem marcada. O grâ-

nulo do amido de aveia se apresenta de forma poligonal, o hilo central pequeno, estrias indefinidas e a cruz de malta marcada, se apresentam como grânulos compostos resultando da aglomeração de grânulos simples, corados com lugol apresentando cor azul-violácea. O grânulo do amido de cevada se apresenta de forma lenticular, o hilo linear, estrias pouco definidas, a cruz de malta marcada.

Na amostra 4 (d) declarada no rótulo pelo seu fabricante o ingrediente batata. Por meio da microscopia foi detectada a presença de

Imagem 1: Comparação das fotomicrografias com as amostras na identificação de amido (a) amostra 1 caracteriza os grânulos de amidos de mandioca e trigo; (b) amostra 9 caracteriza os grânulos de milho; (c) amostra 30 caracteriza os grânulos de amidos de aveia, centeio, cevada e trigo; d) amostra 4 caracteriza os grânulos de féculas de batata.

Amostras	Referências
(a) 	 Mandioca Trigo
(b) 	 Milho
(c) 	 Centeio Aveia Trigo Cevada
(d) 	 Batata



batata e trigo. O grânulo da fécula de batata se apresenta de forma arredondada irregular, o hilo excêntrico na extremidade menor, estrias definidas e a cruz de malta bem marcada e intensa.

Em todas as amostras ilustradas foram encontrados os grânulos do amido de trigo que se apresentam de forma arredondada, com hilo central, estrias mais definidas e a cruz de malta bem marcada. A presença de grânulos de trigo

sugere a presença de glúten ou traços destes, como os grânulos de amido de centeio, cevada e aveia.

Comparação dos resultados obtidos com o método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático e molecular.

Os resultados da comparação do método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático e molecular, da análise de alimentos industrializados declarados pelo fabricante "não contém glúten" e "contém glúten" estão dispostos nos quadros 1 e 2.

Os resultados da comparação do método de triagem por microscopia com o método imunoenzimático, da análise de outros alimentos industrializados declarados pelo fabricante "não contém glúten" e "contém glúten" estão dispostos no quadro 2.

1 A) Declarado: "Não contém glúten"

Código da amostra	Ingredientes	Microscopia	ELISA Conc. calc. de glúten (mg/kg)	PCR
1	Mandioca	Trigo, Mandioca	Não contém glúten 9,00	Trigo, Cevada
2	Farinha de Arroz, Farinha de Soja Integral	Trigo, Cevada, Centeio, Milho	Contém glúten 34,00	Trigo, Cevada
3	Farinha de Arroz, Farinha de Soja Integral	Trigo, Milho, Mandioca	Não contém glúten 11,00	Trigo, Cevada
4	Farinha de Arroz Integral, Farinha de Soja Integral, Amido de Milho	Trigo, Cevada, Centeio, Aveia, Mandioca, Milho	Não contém glúten 8,00	Trigo, Cevada, Aveia
5	Farinha de Arroz, Farinha de Soja Integral	Trigo, Centeio, Mandioca, Milho	Não contém glúten 7,00	Trigo, Cevada
6	Farinha de Arroz, Farinha de Soja Integral	Trigo, Mandioca Milho	Não contém glúten 7,00	Trigo, Centeio, Cevada
7	Farinha de Arroz	Trigo, Centeio, Mandioca, Milho	Contém glúten 30,00	Trigo, Cevada
8	Farinha de Arroz	Trigo, Milho, Mandioca	Não contém glúten 6,20	Trigo, Centeio
9	Tortilhas de Milho	Trigo, Milho, Mandioca	Não contém glúten 6,30	Trigo, Cevada
10	Milho Integral, Fibra de Milho	Trigo, Milho	Não contém glúten 16,00	Trigo, Aveia
11	Canjica de Milho Integral	Trigo, Milho, Cevada	Não contém glúten 11,00	Trigo, Cevada
12	Amido de Milho, Farinha de Arroz	Trigo, Centeio, Mandioca, Milho	Não contém glúten 7,3	Trigo, Cevada
13	Farinha de Arroz, Fécula de Batata, Fécula de Mandioca, Amido de Milho	Trigo, Centeio, Cevada, Milho, Mandioca, Batata	Não contém glúten 13,00	Trigo, Cevada
14	Farinha de Arroz	Trigo, Cevada, Mandioca, Milho	Não contém glúten 19,00	Trigo, Cevada, Aveia
15	Canjica de milho, fibra de milho	Trigo, milho	Não contém glúten 11,00	Trigo, Cevada

IKA

designed for scientists

Até 85 % mais espaço e simultaneamente a mais alta performance.

IKA novos agitadores de hélice:
MICROSTAR E MINISTAR.

GARANTIA
VITALÍCIA!



COMPRE AGORA
www.ika.com



Autores:
 Juliana Machado dos SANTOS^{1*}
 Bruna Amatto Duarte PIRES²
 Victor Augustus MARIN³
 Bruna Kely Barbosa GODOI¹
 Robson Alves LUIZ¹
 Christina Maria Queiroz de Jesus MORAIS¹
 Paola Cardarelli LEITE⁴

1B) Declarado "Contém glúten"

Código da amostras	Ingredientes	Microscopia	ELISA Concck. de gluten(mg/kg)	PCR
16	Farinha de Trigo Integral	Trigo, Cevada Mandioca	Contém glúten 131,0	Trigo, Cevada
17	Farinha de Trigo Integral	Trigo, Centelo, Cevada, Avela, Mandioca, Milho	Não Contém glúten 16,0	Trigo, Centelo Cevada
18	Farinha de Trigo, Farinha de Trigo Integral,	Trigo, Centelo, Cevada, Mandioca, Milho	Contém glúten 160,0	Trigo, Centelo Cevada, Avela
19	Farinha de Trigo Integral e Farinha Trigo, Avela em Flocos, Fécula Mandioca	Trigo, Centelo, Mandioca	Contém glúten 172,0	Trigo, Centelo Cevada, Avela
20	Farinha de Trigo, Amido de Milho	Trigo, Centelo, Cevada, Mandioca, Milho	Contém glúten 113,0	Trigo, Cevada, Avela
21	Farinha de Trigo, Amido de Milho	Trigo, Milho, Mandioca	Contém glúten 175,0	Trigo, Centelo Cevada
22	Farinha de Trigo	Trigo, Centelo, Cevada, Mandioca, Milho	Contém glúten 152,0	Trigo, Centelo, Cevada
23	Farinha de Trigo Integral	Trigo, Centelo, Cevada	Contém glúten 152,0	Trigo, Centelo, Cevada, Avela
24	Farinha de Trigo	Trigo, Centelo, Cevada, Mandioca, Arroz	Contém glúten 147,0	Trigo, Centelo Cevada
25	Farinha de Trigo, Farinha de Trigo Integral	Trigo, Centelo, Cevada, Mandioca	Contém glúten 138,0	Trigo, Centelo, Cevada, Avela
26	Farinha de Trigo, Farinha Trigo Integral, Flocos De Arroz, Farinha De Centelo Integral	Trigo, Centelo, Cevada, Mandioca, Arroz	Contém glúten 123,0	Trigo, Centelo, Cevada
27	Farinha de Trigo	Trigo, Centelo Cevada, Avela, Mandioca	Contém glúten 119,0	Trigo, Centelo, Cevada, Avela
28	Farinha de Trigo, Farelo de Trigo	Trigo, Centelo, Cevada, Avela, Mandioca	Contém glúten 100,0	Trigo, Centelo, Cevada
29	Farinha de Trigo, Farelo de Trigo	Trigo, Centelo, Cevada, Avela, Mandioca	Contém glúten 139,0	Trigo, Centelo, Cevada, Avela
30	Farinha de Trigo, Amido de Milho, Avela	Trigo, Centelo, Cevada, Avela, Milho, Mandioca	Contém glúten 152,0	Trigo, Centelo, Cevada

Quadro 1 Comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático e molecular em biscoitos, declarados pelo fabricante "não contém glúten" (A) e "contém glúten" (B), respectivamente

Quadro 2 Comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático, na análise de outros alimentos industrializados declarados pelo fabricante “não contém glúten” (A) e “contém glúten” (B), respectivamente.

2 A) Declarado: “Não contém glúten”

<i>Código da amostra</i>	<i>Ingredientes</i>	<i>Microscopia</i>	<i>ELISA Conc calc. de glúten (mg/kg)</i>
31	Batata, óleo vegetal de palma e sal	Trigo, Batata	Não Contém Glúten 7,40
32	Fécula de mandioca	Trigo, Centelo, Mandioca	Não contém Glúten 7,85
33	Amido de arroz	Trigo, Mandioca, Milho, arroz	Não contém Glúten 11,50
34	Fécula de Batata	Trigo, Avela, Centelo, Mandioca, Batata	Contém Glúten 35,73
35	Farinha de mandioca, proteína texturizada de soja, óleo vegetal, alho, sal, cebola e condimentos diversos	Trigo, Mandioca, Milho	Não contém Glúten 5,71
36	Farinha de milho	Trigo, Milho, mandioca	Não contém Glúten 6,37

2 B) Declarado: “Contém glúten”

<i>Código da amostra</i>	<i>Ingredientes</i>	<i>Microscopia</i>	<i>ELISA Conc calc. de glúten (mg/kg)</i>
37	Farinha de milho	Trigo, Milho	Não contém Glúten 8,86
38	Fécula de mandioca, Farinha de trigo, proteína vegetal, gordura vegetal, cebola, sal e especiarias	Trigo, Centelo, Mandioca, Milho	Contém Glúten 26,27
39	Farinha de milho	Trigo, Mandioca, Milho, Batata	Não contém Glúten 6,59
40	Farinha de milho, óleo vegetal, alho, sal, cebola e pimentas diversas	Trigo, Centelo, Cevada, Milho	Não contém Glúten 7,62
41	Farinha de milho	Trigo, Milho	Não contém Glúten 6,07

Considerando os resultados da microscopia em comparação com a lista de ingredientes declarados pelo fabricante, tanto nos produtos declarados, contém ou não contém glúten, foi detectado em todos os alimentos a presença de amido, não descrito no rótulo, demonstrando falta de veracidade no rótulo do produto (Quadro 1). Ressaltamos que a Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990, o código de defesa do consumidor, reforça e amplia os preceitos do Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969 considerando que o rótulo constitui uma representação do produto. No

artigo 31, do código de defesa do consumidor consta que o rótulo do alimento deve conter informações de forma correta, clara, precisa e legível sobre os seus componentes^{32,33} (BRASIL,1990). Atualmente, a Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003, reforça o código do consumidor quando se preocupa com os riscos que advém de má informação dos rótulos à saúde do consumidor obrigando que todos os alimentos industrializados contenham em seus rótulos e materiais de divulgação as inscrições “contém glúten” ou “não contém glúten” utilizando como medida

preventiva e de controle da doença celíaca³⁴ (BRASIL,2013).

Estas são informações úteis e necessárias para que o consumidor possa fazer opção de compra, de acordo com suas necessidades e peculiaridades. Segundo Valente³⁵(2002), o acesso à informação correta sobre o conteúdo dos alimentos, por ser um elemento que impacta na adoção de práticas alimentares e estilos de vida saudáveis, configura-se, em seu conjunto, como uma questão de segurança alimentar e nutricional.

De acordo com Sdepanian e colaboradores³ (2001), a



Autores:
Juliana Machado dos SANTOS^{1*}
Bruna Amatto Duarte PIRES²
Victor Augustus MARIN³
Bruna Kely Barbosa GODOI¹
Robson Alves LUIZ¹
Christina Maria Queiroz de Jesus MORAIS¹
Paola Cardarelli LEITE⁴

transgressão à dieta pode ser voluntária ou involuntária, sendo que a segunda pode acontecer, dentre outros fatores, devido à falta de informação dos portadores da doença ou à incorreta inscrição dos ingredientes nos rótulos dos alimentos.

Na comparação de resultados obtidos com a lista de ingredientes declarados, na análise das quinze amostras declaradas pelo fabricante não contém glúten, em quinze amostras foi detectada a presença de trigo, em cinco amostras foi detectada a presença de cevada, em seis amostras foi detectada a presença de centeio e em uma amostra, de aveia. A Lei N°10.674, de 16 de maio de 2003, afirma que todos os alimentos industrializados que contenham em sua composição fonte de glúten, como trigo, aveia, cevada, malte e centeio deverão conter as inscrições "contém glúten"³⁴.

Nas amostras de biscoitos declarados pelo fabricante "contém glúten" foi detectada a presença de ingredientes não declarados em sua composição pelo fabricante.

Nas outras onze amostras descritas no quadro 2, que são alimentos naturalmente livres de glúten, que deveriam conter em seus rótulos grafado "não contém glúten" temos informações distintas declaradas no rótulo (quadro 2). Nas cinco amostras declaradas pelo fabricante "não contém glúten", em quatro foi detectado trigo, em duas, centeio e em uma, aveia. Nas

outras cinco amostras declaradas pelo fabricante "contém glúten" em quatro foi detectada a presença de trigo, em duas, de centeio e em uma, de cevada. Atualmente a legislação brasileira, Lei 10.674 de 16 de maio de 2003, corrobora com esta "desinformação", pois não exige a comprovação laboratorial quanto a eventual presença de glúten³⁴. A inadequação acerca da rotulagem de produtos que contém glúten é preocupante, pois a presença do glúten é prejudicial para portadores da DC.

A presença de outros ingredientes detectados sugere a presença de contaminação cruzada por falta de boas práticas de fabricação, devendo ser considerada, pois os pacientes celíacos possuem individualidades imunológicas e alguns podem ser susceptíveis a uma quantidade menor que 20 mg/kg. Segundo Johnson e colaboradores³⁶(2011) casos de contaminação cruzada também ficam sem controle, pois, no mundo todo apenas o Japão e a Suíça contemplam esses casos em suas legislações.

Na comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático e molecular, em alimentos declarados pelo fabricante "contém glúten" e "não contém glúten", das 30 amostras analisadas, o cereal trigo foi encontrado em todas as 30 amostras quando realizados os métodos ELISA, PCR e Microscopia (concordância = 100%) considerada uma concordância quase perfeita.

ta, o cereal cevada foi identificado pelo método PCR em 28 amostras e destas em 20 por microscopia (concordância = 71,46%), considerada uma concordância substancial; o cereal aveia foi identificado pelo método PCR em 11 amostras e destas em 6 por microscopia (concordância = 54,55%), considerada uma concordância moderada; o cereal centeio foi identificado pelo método PCR em 15 amostras e destas em 14 por microscopia (concordância = 93,33%), considerada uma concordância quase perfeita.

Para as amostras declaradas em seu rótulo "não contém glúten" das 15 amostras: em 15 foi detectada a presença de trigo, tanto pelo método de PCR como de Microscopia (concordância = 100%), considerada uma concordância quase perfeita; em 15 foi detectada a presença de cevada pelo método de PCR e em 13 amostras por Microscopia (concordância = 81,25%), considerada uma concordância quase perfeita; em 15 amostras foi detectada a presença de centeio por PCR e em 14 por Microscopia (concordância = 93,33%), considerada uma concordância quase perfeita. Em 8 amostras foi detectada a presença de aveia pelo método de PCR e em 5 por microscopia (concordância = 62,50%) considerada uma concordância substancial, indicando a presença de glúten.

Para as amostras declaradas em seu rótulo "contém glúten" das 15 amostras: em 15 foi detectada a presença de trigo, tanto pelo método de PCR como de Microscopia (concordância = 100%), considerada uma concordância quase perfeita; em 15 foi detectada a presença

de cevada pelo método de PCR e em 13 amostras por Microscopia (concordância = 81,25%), considerada uma concordância quase perfeita; em 13 amostras foi detectada a presença de centeio por PCR e em 12 por Microscopia (concordância = 92,31%), considerada uma concordância quase perfeita. Em 7 amostras foi detectada a presença de aveia pelo método de PCR e em 2 por microscopia (concordância = 28,57%) considerada uma concordância razoável.

Neste estudo a Microscopia serviu como método de triagem, não sendo possível quantificar o amido. No método ELISA R5 utilizado no trabalho de Pires²⁸ (2013) para análise de teor de glúten, que possibilita a detecção de até 1,5 ppm de gliadina ou 3 ppm de glúten das prolaminas do trigo que é a gliadina, o único padrão utilizado. Entretanto, nas amostras estudadas além de ser demonstrada a presença de trigo, também foi detectada presença de cevada, centeio, aveia, que, idealmente, deveriam ser quantificadas. Tanto a microscopia como o PCR serviram para definir as características dos produtos encontrados no mercado, quando se trata de alimentos para celíacos, faz-se necessário analisar outros cereais além do trigo.

Qualquer proteína vegetal comercial derivada de uma fonte cereal inevitavelmente contém grânulos de amido, a morfologia do qual serviria de diagnóstico para esse cereal, uma proteína vegetal comercial derivada de milho deverá conter amido de milho, que apresenta forma poliédrica característica. O amido de trigo é amplamente usado como um ingrediente, a identificação dos grânulos de amido de trigo em uma matriz de proteínas é apenas um guia para a origem da proteína, existindo a necessidade da reali-

zação de um ensaio de confirmação que caracteriza a proteína³⁷ (KENT-JONES, AMOS apud FLINT; JOHNSON, 1979).

No quadro 2, das cinco amostras declaradas no rótulo "não contém glúten," analisadas pelo método ELISA, em quatro os resultados do teor de glúten foram abaixo de 20 mg/kg, como preconizado pelo CODEX, em duas amostras foram detectadas a presença de trigo e centeio. Destas amostras analisadas por Microscopia foi identificada a presença de trigo em cinco amostras. Neste caso ocorrem traços da presença de glúten, sugerindo contaminação cruzada por falta de boas práticas de produção, incorrendo na não veracidade do rótulo. Das cinco amostras declaradas no rótulo contém glúten e analisadas pelo método ELISA, quatro amostras (80%) continham glúten abaixo de 20 mg/kg, podendo ser rotulados como não contém glúten. Destas amostras analisadas por Microscopia foi identificada a presença de trigo em todas as amostras (concordância = 100%), no entanto, o produtor possivelmente para não correr riscos e não se responsabilizar pelo ato, identifica o produto como contendo glúten, incorrendo na não veracidade do rótulo, mesmo o produto sendo livre naturalmente de glúten é declarado como "contém glúten". Infelizmente alguns produtores desconhecem ou não se importam com o problema da contaminação e continuam vendendo seus produtos sem a devida análise do teor de glúten. Esta prática é preocupante, pois faz diminuir a diversidade de produtos no mercado, e por vezes torna um produto naturalmente livre de glúten, sem necessidade de tratamento para retirada do glúten, não recomendado aos celíacos, o que leva a uma elevação no custo dos produtos para os

celíacos dificultando o acesso à população carente.

Outro ponto a ser considerado é que apesar do CODEX estabelecer um limite para o teor de glúten para alimentos livres dele, a legislação brasileira, contrariando a tendência mundial de seguir estas determinações, não coloca um limite para esse teor^{38,36} (SILVA, 2010; JOHNSON et al, 2011).

Em contrapartida, na Austrália o excesso de rigor em alimentos sem glúten, exigindo que não contenha glúten detectável, tem causado escassez de produtos desta natureza devido ao custo elevado na produção com isenção de glúten e tem havido movimentos de associações de celíacos para que a legislação se adeque ao recomendado pelo CODEX, visando aumentar a oferta dos produtos sem glúten³⁹ (LEDERMAN, 2013).

No Brasil existe pouca diversidade de alimentos se considerarmos um limite de 20 mg/kg como declara o CODEX e um possível aumento no rigor para o limite de 10 mg/kg, buscado pela Consulta pública Nº 29 de 05 de junho de 2014, poderá causar uma diminuição ainda maior da diversidade de produtos no mercado⁴⁰. Silva (2010) recomenda manter os limites preconizados pelo CODEX e aumentar a fiscalização para evitar as fraudes e oferecer incentivos fiscais aos produtores de alimentos sem glúten para tornar mais atrativa economicamente a produção destes alimentos. O avanço em relação a identificação dos alimentos livres de glúten possibilitou à população celíaca o consumo de alimentos antes proibidos³⁸ (SILVA, 2010). A RDC nº 26, de 02 de julho de 2015, que dispõe sobre alimentos que causam alergias alimentares, obriga que seja declarado no rótulo na lista de ingredientes, quando houver, trigo, centeio, cevada, aveia



e suas estirpes hibridizadas¹².

O movimento "gluten-free" tem levado, no mundo inteiro, pessoas não portadoras de doença celíaca a buscar dietas a base de produtos livres de glúten. As principais justificativas para esta dieta, sem glúten, seriam as modificações genéticas introduzidas nas plantas ao longo dos anos e o aumento do consumo de trigo. Só nos Estados Unidos, 28,5% das pessoas dizem querer reduzir ou eliminar essa substância da dieta. Naquele país o mercado de alimentos sem glúten já movimentou mais de 10 bilhões de dólares por ano⁴¹ (PANDOLFI et al, 2014). Sendo esta procura aumentada mais um fator de elevação do preço destes produtos.

A escolha de um método padrão de determinação de glúten e de sua quantidade limite é necessária tanto para determinar o conteúdo de glúten quanto para servir de base para novas regulamentações. Ainda é necessária uma política de vigilância mais efetiva de forma a fiscalizar minuciosamente o produto que chega até o consumidor celíaco^{42,38} (THOMPSON; MENDEZ, 2008; SILVA, 2010).

É fundamental não apenas regulamentar alimentos, mas fazer a indústria de alimentos cumprir a legislação, por meio da rotulagem que garanta a veracidade das informações e sua comprovação e consequentemente a segurança alimentar, promovendo a prevenção à saúde dos consumidores.

O estudo realizado sugere que o controle da qualidade dos alimentos tem sido um dos grandes desafios colocados para a indústria alimentar, pois somente a informação sem garantir a qualidade do produto e autenticidade das declara-

ções feitas nos rótulos não são suficientes.

Conclusão

A microscopia apresentou boa concordância com os métodos ELISA e PCR na detecção do trigo, confirmando sua relevância para este propósito.

O método de microscopia pode ser utilizado como método de triagem na identificação de amido em alimentos industrializados, estudados neste trabalho, descritos no rótulo "não contém glúten e contém glúten". É um método confiável, sensível e de grande relevância dada a sua concordância satisfatória com o método preconizado, ELISA, pelo CODEX Alimentarius.

Referências

- (1) PENNA, F.J.; MOTA, J.A.C.; FAGUNDES NETO, U. Doença celíaca. In: FAGUNDES NETO, U.; WHEBA, J.; PENNA, F.J. Gastroenterologia Pediátrica. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi; p.227-35. 1991.
- (2) POLANCO, I. Enfermedad Desafio. In: Argüelles F, Polanco I, ed. Manual de gastroenterología pediátrica. Granada: Copartgraf, p.261-8,1996.
- (3) SDEPANIAN, V.L.; MORAIS, M.B.; NETO, U.F. Doença celíaca: características clínicas e métodos utilizados no diagnóstico de pacientes cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil. *Jornal de Pediatria*, v.77; n.2, p.131-8, 2001.
- (4) ROESSLER, J.L. et al. Enfermedad celíaca ver el adolescente y adulto joven. *Revista Desafio para gastroenterólogos de niños y adultos. Revista Méd*
- (5) DUBÉ, C. et al. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology*, v.128, n.1, p.57-67, 2005.
- (6) FASANO, A. et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large mul-

ticenter study. *Arch Intern Med.*, v.163, p. 286-92, 2003.

(7) GANDOLFI, L. et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol*, v. 95, p.689-92, 2000.

(8) NISHIHARA RM, KOTZE LM, MOCELIN V et al. Serological investigation of celiac disease in southern area from Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2005.

(9) WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*. v.24, n. 2, p.115-9. 2007.

(10) VADER, .L.W, STEPNIAK, D.T., BUNNIK, .E.M. et al. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology* v.125, n.4, p.1105-13, 2003.

(11) CODEX Alimentarius. CODEX Standard for Foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. CODEX STAN 118 – 1979 (amended 1983, revised 2008). CODEX STAN 188 – 1979, 2008. Food legal AFN 29 May, 2013. Disponível em: <http://ausfoodnews.com.au/2013/05/27/gluten-free-debate-as-afgc-pushes-for-change.html>. Acessado em 13/09/2014.

(12) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC n 26, de 02 de julho de 2015. Dispõe sobre Rotulagem de Alergênicos em Alimentos. Diário Oficial da União, 3 de julho de 2015.

Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_26_2015.pdf/2515984c-910e-4141-9217-ba546a62a63b. Acessado em: 10/10/2015.

(13) POMERANZ, Y. *Modern Cereal Science and Technology*. New York: VCH Publishers, 1987.

(14) CORNELL, H. The chemistry and biochemistry of wheat. In: CAUVAIN, S. P. (Ed). *Bread Making: improving quality*. Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.

(15) TOSI, P. et al. *Annals of Botany, Oxford Journals*, v. 108, n. 1, 2011.

(16) BEUX, M.R. Atlas de Microscopia Alimentar. Identificação de elementos histológicos vegetais. São Paulo: Livraria Varela, 1997.80 p.

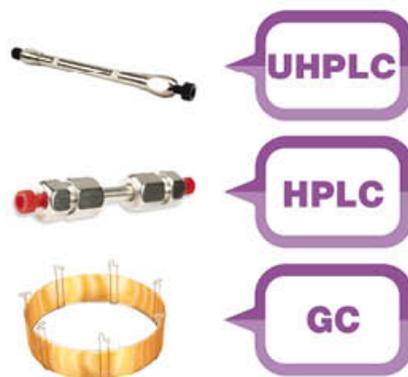
(17) FLINT, O. Microscopia de los



Colunas:

ALTO DESEMPENHO EM QUALQUER SISTEMA DE HPLC/UHPLC E GC

- ✓ Analíticas
- ✓ Fase-Reversa
- ✓ Preparativas e Semi-Preparativas



COLUNAS

GERADOR DE GASES

Leman Instruments



GASES

- H₂ HIDROGÊNIO**
- N₂ NITROGÊNIO**
- Ar AR PURO E ULTRA PURO**
- O₂ OXIGÊNIO**

ALTA PUREZA

- 45 = 99,99%**
- 50 = 99,999%**
- 55 = 99,9995%**
- 60 = 99,9999%**
- 65 = 99,99995%**

SEM CILINDROS



GERADOR DE GASES

Compatíveis com Espectrômetros de Massa ABSCIEX, AGILENT, BRUKER entre outras marcas de qualidade.

- ✓ Grande redução dos custos de operação.
- ✓ Geração contínua dos gases com estabilidade na pressão de saída.
- ✓ Não necessita de tubulações especiais de aço inoxidável ou cobre, que dependendo do projeto são mais caras que o próprio equipamento!
- ✓ Eliminam todas as desvantagens associadas à compra, manuseio de cilindros de alta pressão e construção de locais especiais para armazenamento.
- ✓ Sem contratos, taxas de aluguel e de entrega com os fornecedores de gases.
- ✓ Com pureza de até 99,99995% atende até as necessidades mais críticas.
- ✓ A filosofia modular dos geradores permite a instalação de múltiplas unidades em paralelo.
- ✓ O menor custo de manutenção do mercado!
- ✓ Equipamento modular, robusto e facilmente transportável.
- ✓ Ocupa pouco espaço e pode ser colocado em baixo de uma bancada de trabalho com total segurança.



MODELO RACK 19"



MODELO DE BANCADA



MODELO DE CHÃO

VISITEM-NOS NA FEIRA ANALITICA
VOCÊ SERÁ MUITO BEM VINDO!



Visite-nos na feira referência em inovação e tendências da química analítica.

www.analicanet.com.br



Autores:
Juliana Machado dos SANTOS^{1*}
Bruna Amatto Duarte PIRES²
Victor Augustus MARIN³
Bruna Kely Barbosa GODOI¹
Robson Alves LUIZ¹
Christina Maria Queiroz de Jesus MORAIS¹
Paola Gardarelli LEITE⁴

alimentos. Manual de métodos práticos utilizando La microscopia óptica. Zaragoza: Ed. Acribia, 1996.

(18) GUTIÉRREZ, J.A.F. et al. Physico-chemical Properties of casein-starch interaction obtained by extrusion process. *Starch*, v.56, n. 5, p. 190-198, 2004.

(19) FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. *J. Anim. Sci.*, v.37, n.4, p.1048-61, 1973.

(20) GUILBOT, A.; MERCIER, C. *Starch*. In: ASPINALL, G.D. The polysaccharides. New York: Academic Press, v.3, p.229-285, 1985.

(21) YOUNG, H. Fractionation of starch. In: WHISTLER, RL; BEMILLER, J. N.; PASCALL, E. F. (Ed.). *Starch chemistry and technology*. 2. ed. Orlando, USA: Academic Press, p. 249-283, 1984.

(22) KOSSMAMN, J.; LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*. v.19, n.3, p.171-226, 2000.

(23) DENARDIN, C.C.; SILVA, L.P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedade físico-químicas. *Ciência Rural*, v.39, n.3, p.945-954, 2009.

(24) SOUZA, R. C. R.; ANDRADE, C. T. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, São Paulo, v. 10, n.1, p. 24-30, 2000.

(25) VAN HUNG, P.; MAEDA T.; MORITA, N. Waxy and high-amylose wheat starches and flours—characteristics, functionality and application. *Science Direct*, v. 17, n. 8, p. 448–456, ago. 2006.

(26) GALLANT, D.J. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *Eur. J Clin. Nutr.* London, v.46, n.2, p.3-16, 1992.

(27) RODRIGUES, R. M. S. et al. Métodos de análise microscópica de alimentos. São Paulo: Letras e Letras, 1999. p.21 e 35.

(28) PIRES, B. A. D. Análise qualitativa de glúten em alimentos: Métodos Imu-

noquímicos e Moleculares. Dissertação de Mestrado em Vigilância Sanitária, FIOCRUZ- INCQS, 2013.

(29) MORAIS, C. M. Q. J. et al. Avaliação das informações referentes à presença ou não de glúten em alguns alimentos industrializados. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 73 (3), 259-263, 2014.

(30) LANDIS, J.R., KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v.33, p.159–174, 1977.

(31) SANTOS, T.V. Fotomicrografia digital para estudos taxonômicos de Flebotomíneos do subgênero *Psychodopygus* do estado do Pará - Brasil. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Belém, 2011. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais.

(32) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 12 set. 1990a. supl.176, p.1-12.

(33) BRASIL. Ministério da Marinha de Guerra, Ministério do Exército e Ministério da Aeronáutica Militar (ministérios do Governo Militar). Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui Normas Básicas sobre Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 21 out.1969, p. 8935 e com retificação no D.O.U. 11 de nov.1969 p. 9737.

(34) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 19 maio 2003a. Disponível em:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/110.674.htm. Acessado em :05 jan. 2013.

(35) VALENTE, F.L.S.V. Do combate à fome à segurança alimentar e nutricional: o direito à alimentação adequada. Cortez, São Paulo, 2002.

(36) JOHNSON, P. E. et al. Detection of Alergens in Food. In: HENGEL, A. J. V. (Ed). *Food Allergens, Analysis, Instrumentation and Methods*. Boca Raton: CRC Press LLC, 2011.

(37) FLINT, O.; JOHNSON R. F. P. Histochemical Identification of Commercial Wheat Gluten. *Analyst*, v. 104, p. 1135-37, 1979

(38) SILVA, R. P. Detecção e quantificação de glúten em alimentos industrializados por técnica de ELISA. Dissertação de Mestrado em Ciências em Gastroenterologia Clínica da Universidade de São Paulo. 2010.

(39) LEDERMAN, J. Freedom Foods: “gluten-free – should always mean free from gluten”

(40) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 29, de 05 de junho de 2014. Dispõe sobre requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares. Rotulagem de Alergênicos em Alimentos. *Diário Oficial da União, DF*, 09 jun. 2014. Disponível em: http://www.idec.org.br/uploads/audiencias_documentos/anejos/proposta_em_consulta.pdf. Acessado em 10/10/2014.

(41) PANDOLFI, R. et al. A verdade sobre o glúten. Super interessante. Imprensa Gráfica Abril, 2014.

(42) THOMPSON, T.; MENDEZ, E. Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-free Foods: Why They Are Not Created Equal. *Journal of the American Dietetic Association*, v.108, n. 10, p. 1682 – 87, out. 2008