

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

Juliana Machado dos Santos

**IDENTIFICAÇÃO DE AMIDOS POR MICROSCOPIA ÓTICA COMO  
MÉTODO DE TRIAGEM EM ALIMENTOS FARINÁCEOS, BISCOITOS E  
FARINHAS, DECLARADOS NO RÓTULO “CONTÉM GLÚTEN” E “NÃO  
CONTÉM GLÚTEN”.**

Rio de Janeiro

2015

Juliana Machado dos Santos

**IDENTIFICAÇÃO DE AMIDOS POR MICROSCOPIA ÓTICA COMO  
MÉTODO DE TRIAGEM EM ALIMENTOS FARINÁCEOS, BISCOITOS E  
FARINHAS, DECLARADOS NO RÓTULO “CONTÉM GLÚTEN” E “NÃO  
CONTÉM GLÚTEN”.**

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 para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Santos, Juliana Machado dos

Identificação de amidos por microscopia óptica como método de triagem em alimentos farináceos, biscoitos e farinhas, declarados no rótulo “contém glúten” ou “não contém glúten”/Juliana Machado dos Santos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

112 f., il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2015.

Orientadora: Paola Cardarelli Leite

1. Microscopia. 2. Amido. 3. Método Rápido. 4. Glúten I.Título.

Juliana Machado dos Santos

IDENTIFICAÇÃO DE AMIDOS POR MICROSCOPIA ÓTICA COMO  
MÉTODO DE TRIAGEM EM ALIMENTOS FARINÁCEOS, BISCOITOS E  
FARINHAS, DECLARADOS NO RÓTULO “CONTÉM GLÚTEN” E “NÃO  
CONTÉM GLÚTEN”.

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: 27 / 03 / 2015

BANCA EXAMINADORA

---

Silvana do Couto Jacob (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Mirian Ribeiro Leite Moura (Doutora)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

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

---

Paola Cardarelli Leite (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho aos  
celíacos e seus familiares.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela oportunidade de trabalho.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde na gestão do diretor Eduardo Leal e ao chefe de Departamento Filipe S. Quirino da Silva pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

Aos meus pais, Mauro Luiz dos Santos e Leatrice Machado dos Santos, início de tudo, por ser o que sou e conquistei.

A minha irmã Cláudia, aos meus avós paternos, Dinaura e Manoel, e maternos, Leopoldina e Marcelo, com saudades e carinho.

Aos meus filhos, Wlamir Filho e Hugo, ao esposo Wlamir, pela alegria de podermos caminhar juntos e com muito amor.

A minha orientadora Dra. Paola Cardarelli Leite pela amizade e pela orientação em pesquisa.

Aos amigos de trabalho do INCQS pelo carinho, atenção e apoio em especial à Dra. Christina Maria Queiroz de Jesus Moraes.

Ao Prof. Victor Augustus Marin e a Bruna Amatto Duarte Pires pelo fornecimento de amostras e dados que foram de grande importância para a realização do trabalho.

Ao colega Microscopista do MAPA - LANAGRO Pedro Leopoldo de Minas Gerais, Ronaldo Sanches, pelo seu entusiasmo e dedicação em passar seus conhecimentos científicos e sua experiência na área, que foram relevantes ao trabalho.

À estagiária, Bruna Kely Barbosa Godoi, aluna do PROVOC (Programa de Vocação Científica), que demonstrou ser uma ótima companheira de trabalho.

Manter a ordem, em vez de corrigir a desordem, é o princípio básico da sabedoria. Curar a doença depois que ela aparece é como cavar um poço quando se tem sede.

Nei Jing, séc. II a. C.

## RESUMO

A proposta deste trabalho foi desenvolver um método rápido, de baixo custo por microscopia para identificar amidos presentes em alimentos farináceos declarados no rótulo “não contém glúten” ou “contém glúten”. O glúten se encontra combinado com o amido em alguns dos cereais que o contém e é a proteína ligada à fisiopatogenia da doença celíaca. 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 cevada. A microscopia constitui um método rápido, efetivo, de baixo custo, sendo uma excelente ferramenta auxiliar na análise laboratorial, proporcionando uma informação que complementa a fornecida pelas análises físico-químicas e há muito tempo tem sido utilizada como ferramenta para avaliação da qualidade dos alimentos. A partir dos parâmetros de desempenho, seletividade e limite de detecção, para validação de métodos analíticos qualitativos, como o ensaio em questão, a microscopia pode ser considerada um método de análise conforme pois atende aos requisitos analíticos, com limite de detecção inferior do método em biscoito foi 10 mg/kg e do método em farinha foi 5 mg/kg e permitiu uma boa distinção entre os amidos. A microscopia apresentou boa concordância com os métodos ELISA e PCR na detecção do 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 Rápido; Glúten.



## **ABSTRACT**

The purpose of this study was to develop a rapid, low cost assay by microscopy to identify starches present in starchy foods declared on the label "contains gluten" or "gluten-free". Gluten combines with some grains containing starch and is the protein linked to the pathogenesis of the celiac disease. Starches make part of the composition of various foods such as rice, maize, cassava starch, potato starch, sweet potato starch. Including those that contain gluten as wheat, oat, rye and barley. Microscopy is a fast, effective, low cost technique and it is an excellent tool to assist in laboratory analysis, providing information that complements those provided by the physico-chemical analysis and has been used for long as an assessment tool for food quality. Evaluating the performance parameters selectivity and detection limit for validating qualitative analytical methods, such as the test in question, microscopy can be considered a method of analysis in conformity with the analytical requirements, presenting a lower detection limit for cookie of 10 mg / kg and for flour 5 mg / kg and a good distinction between the starches. Microscopy showed good agreement with the ELISA and PCR methods in wheat detection, confirming its relevance for this purpose. Microscopy is a reliable and sensitive method and can be used as a screening method.

Keywords: Microscopy; Starch; Rapid Method; Gluten

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Formação do glúten. a) Representação da prolamina (gliadina e gluteninas)	22
b) Representação das ligações de pontes de hidrogênio, ligações de Van der Waals e pontes de dissulfeto.....	22
<b>Figura 2</b> Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b).....	39
<b>Figura 3</b> Estrutura interna do grânulo de amido.....	41
<b>Figura 4</b> Grânulo de amido de trigo.....	42
<b>Figura 5</b> Grânulo de amido de centeio.....	43
<b>Figura 6</b> Grânulo de amido de cevada.....	43
<b>Figura 7</b> Grânulo de amido de aveia.....	44
<b>Figura 8</b> Grânulo de amido de arroz.....	44
<b>Figura 9</b> Grânulo de fécula de batata.....	45
<b>Figura 10</b> Grânulo de fécula de mandioca.....	45
<b>Figura 11</b> Grânulo de amido de milho.....	46
<b>Figura 12</b> Características morfológicas dos grânulos de amidos e fécula dos alimentos quando são observados com iluminação intensa e entre polarizadores cruzados.....	47
<b>Figura 13</b> Estado do amido de trigo em produtos de padaria.....	52
<b>Quadro 1</b> Principais características microscópicas dos grânulos de amido e de féculas.....	
<b>Quadro 2</b> Descrição das amostras de alimentos farináceos, biscoitos, declarados no rótulo “não contém glúten” (PIRES, 2013).....	49
<b>Quadro 3</b> Descrição das amostras de alimentos farináceos, biscoitos, declarados no rótulo “contém glúten” (PIRES, 2013).....	59
<b>Quadro 4</b> Descrição das amostras de alimentos farináceos, farinhas, declarados no rótulo “contém glúten” (MORAIS et al, 2013) .....	60
<b>Quadro 5</b> Descrição das amostras de alimentos farináceos, farinhas, declarados no rótulo “não contém glúten” (MORAIS et al, 2013).....	61
<b>Quadro 6</b> Resultados do método de triagem por microscopia dos alimentos farináceos, biscoitos, declarados pelo fabricante “não contém glúten”.....	61

<b>Quadro 7</b> Resultados do método de triagem por microscopia dos alimentos farináceos, biscoitos, declarados pelo fabricante “contém glúten”.....	73
<b>Quadro 8</b> Resultados do método de triagem por microscopia dos alimentos farináceos, farinhas, declarados pelo fabricante “não contém glúten”.....	74
<b>Quadro 9</b> Resultados do método de triagem por microscopia dos alimentos farináceos, farinhas, declarados pelo fabricante “contém glúten”.....	75
<b>Quadro 10</b> Comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático e molecular, da análise de alimentos farináceos, biscoitos, declarados pelo fabricante “não contém glúten”.....	75
<b>Quadro 11</b> Comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático e molecular na análise de alimentos farináceos, biscoitos, declarados pelo fabricante “contém glúten”.....	76
<b>Quadro 12</b> Comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático, na análise de alimentos farináceos, farinhas, declarados pelo fabricante “não contém glúten”.....	77
<b>Quadro 13</b> Comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com o método imunoenzimático, na análise de alimentos farináceos, farinhas, declarados pelo fabricante “contém glúten”.....	78
<b>Imagem 1</b> a) arroz temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C (aumento 200X); b) arroz temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C com luz polarizada (aumento 200X); c) arroz aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada (aumento 400X).....	78
<b>Imagem 2</b> a) aveia temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C (aumento 200X); b) aveia temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C com luz polarizada (aumento 200X); c) aveia aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma (aumento 400x).....	65
<b>Imagem 3</b> a) batata temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C; b) batata temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C ; c) batata aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma sem e com luz polarizada.....	67

<b>Imagem 4</b> a) centeio temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C (aumento 200X); b) centeio aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma (aumento 200X); c) centeio aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada (aumento 200X).....	68
<b>Imagem 5</b> a) cevada temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C (aumento 200X); b) cevada aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma (aumento 200X) ; c) cevada aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada (aumento 200X).....	68
<b>Imagem 6</b> a) mandioca temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C; b) mandioca temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C com luz polarizada; c) mandioca aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada .....	69
<b>Imagem 7</b> a) trigo temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C; b) trigo temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C com luz polarizada; c) trigo aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada .....	70
<b>Imagem 8</b> a) milho temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C; b) milho temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) °C com luz polarizada; c) milho aquecimento levando à ebulição (>100 °C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada.....	71
<b>Imagem 9</b> Amido presente no analito no limite de detecção 10 mg/kg.....	72
<b>Imagem 10</b> Amido presente no analito no limite de detecção 5 mg/kg.....	80

## **LISTA DE SIGLAS**

FDA	Food and Drug Administration
AFGC	Australian Council Food and Groceries
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand
FENALCEBRA	Federação Nacional das Associações de Celíacos do Brasil
ALCEBRA	Associação de Celíacos do Brasil
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DC	Doença Celíaca
DNA	Deoxyribonucleic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 DOENÇA CELÍACA.....	15
1.1.1 Histórico.....	15
1.1.2 Definição.....	17
1.1.3 Diagnóstico.....	18
1.1.4 Tratamento.....	18
1.1.5 Estudos Epidemiológicos da doença celíaca.....	19
1.2 GLÚTEN.....	21
1.3.LIMITES ACEITÁVEIS DE GLÚTEN EM PRODUTOS.....	23
1.4 REGULAÇÕES.....	24
1.4.1 Regulações Internacionais de Alimentos para produtos contendo glúten.....	24
1.4.2 Regulações Nacionais de Alimentos para produtos contendo glúten.....	26
1.5 AÇÕES DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA E SEGURANÇA ALIMENTAR.....	29
1.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO GLÚTEN EM ALIMENTOS.....	33
1.7 MICROSCOPIA DE ALIMENTOS.....	35
1.7.1 Histórico.....	35
1.7.2 Definição e Aplicação.....	36
1.8 AMIDO.....	38
1.8.1 Identificação dos grânulos de amidos.....	41
1.8.2 Principais características microscópicas dos grânulos de amido de diferentes espécies vegetais.....	42
1.8.3 Propriedades físicas do amido: Gelatinização e Retrogradação.....	50
1.8.4 Aplicação da identificação de amidos.....	53
1.9 MÉTODOS DE TRIAGEM.....	54
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	57
2.1 OBJETIVO GERAL.....	57
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
<b>3 METODOLOGIAS</b> .....	58
3.1 AMOSTRAS.....	58

3.2 PRODUÇÃO DE FOTOMICROGRAFIAS PADRÕES DE REFERÊNCIA.	62
3.3 IDENTIFICAÇÃO DO AMIDO POR MICROSCOPIA NAS AMOSTRAS DE BISCOITOS.....	62
3.4 IDENTIFICAÇÃO DO AMIDO POR MICROSCOPIA NAS AMOSTRAS FARINHAS.....	63
3.5 LIMITE DE DETECÇÃO E SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA BISCOITOS.....	63
3.6 LIMITE DE DETECÇÃO E SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA FARINHAS.....	64
3.7 CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NOS MÉTODOS ELISA, PCR E MICROSCOPIA.....	64
<b>4 RESULTADOS</b> .....	65
4.1 PRODUÇÃO DE FOTOMICROGRAFIAS COMO MATERIAL DE REFERÊNCIA.....	65
4.2 IDENTIFICAÇÃO DE AMIDOS POR MICROSCOPIA.....	72
4.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM O MÉTODO DE TRIAGEM POR MICROSCOPIA COM OS MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICO E MOLECULAR.....	75
4.4 LIMITE DE DETECÇÃO E SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA BISCOITOS.....	79
4.5 LIMITE DE DETECÇÃO E SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA FARINHAS.....	79
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	80
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	86
<b>PERSPECTIVA</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87
<b>APÊNDICE A - FOTOS DA IDENTIFICAÇÃO DO AMIDO POR MICROSCOPIA ÓTICA DAS AMOSTRAS DE BISCOITOS E FARINHAS</b> .....	99

## 1 . INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇA CELÍACA.

#### 1.1.1 Histórico

No período Neolítico cerca de 9500 a.C., os seres humanos cultivavam cereais, na Ásia Ocidental, e se estima que a doença celíaca não tenha acontecido antes deste tempo. O primeiro relato da doença foi no século II a.C. por *Aretaeus da Cappadocia*, registrou uma síndrome de má absorção com diarreia crônica, denominou de “celíaca Affection” e ganhou a atenção da medicina ocidental sendo reconhecido quando Francis Adams apresentou uma tradução da obra de Aretaeus na Sociedade Sydenham em 1856. Os sintomas do paciente descrito por *Aretaeus* eram dor no estômago, estômago atrofiado, palidez, fragilidade levando a incapacidade de trabalho. A diarreia se manifestava com fezes que eram brancas, malcheirosas e acompanhada de flatulência, e a doença era intratável e passível de retorno periódico. Aretaeus acreditava que seria falta de calor no estômago necessária para digerir os alimentos e reduzida capacidade de distribuir os produtos da ingestão por todo o corpo, esta digestão incompleta, resultando em diarreia. Ele considerou como uma aflição do idoso e que afetava comumente às mulheres, explicitamente excluindo as crianças (LOSOWSKY, 2008).

Em 1887, o pediatra Samuel Gee reconheceu descrições de *Aretaeus* e os termos da doença e adotou o mesmo nome, “doença celíaca”. Apresentou a descrição moderna em uma palestra no Hospital pediátrico da rua “Great Ormond”, em Londres. 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 (GEE, 1887 apud SDEPANIAN; MORAIS; NETO, 1999).

Em 1908, um médico americano, Christian Archibald Herter, escreveu um livro onde relatou após observar crianças com a doença celíaca, que denominou de “infantilismo intestinal”, o crescimento destas foi retardado e que a gordura foi melhor tolerada do que carboidratos. O epônimo doença Gee-Herter foi algumas vezes usado para demonstrar ambas as contribuições (HERTER, 1908 apud PERLMUTTER, 2014).



Em 1924, Sidney V. Hass um pediatra americano utilizou uma dieta a base de bananas até que a verdadeira causa da doença fosse determinada (HASS, 1927 apud PERLMUTTER, 2014).

No entanto, foi durante o período da Segunda Guerra Mundial (1940 -1945), que o médico holandês Willem Karel Dicke associou os efeitos deletérios de certos tipos de cereais à doença celíaca. Neste período, o pediatra holandês, observou que durante o período de racionamento de trigo na segunda Guerra Mundial, houve uma queda significativa na taxa de mortalidade entre crianças afetadas pela doença celíaca. O médico passou a utilizar uma dieta simples que consistia na exclusão de pão e biscoitos. No final da Guerra, quando os aviões suecos trouxeram pão para a Holanda, as crianças com doença celíaca voltaram rapidamente a apresentar sintomas, confirmando a importância do trigo na gênese da doença e a taxa de mortalidade subiu para os níveis anteriores. (DICKE, 1950 apud BERGE-HENEGOUWEN, 1993).

Em 1950, Dicke escreveu seu trabalho de tese, um estudo meticuloso que se iniciou em 1936, onde relatou o caso de uma paciente que, quando hospitalizada, recebeu dieta estritamente isenta de glúten, sendo observado remissão dos sintomas, com ganho de peso e estatura. A associação com o componente do glúten de trigo foi feita em 1952 por uma equipe de Birmingham, Inglaterra. A atrofia das vilosidades foi descrita pelo médico britânico John W. Paulley em 1954 em amostras colhidas durante cirurgias. Com o advento da biópsia do intestino delgado peroral, comprovaram-se as características histopatológicas da mucosa intestinal na doença celíaca (RUBIN et al, 1960).

Ao longo da década de 1960, outras características da doença celíaca foram elucidadas. Seu caráter hereditário foi reconhecido em 1965. Em 1966, a dermatite herpetiforme foi relacionada à sensibilidade ao glúten. A partir da década de 1980 a doença celíaca deixou de ser considerada uma condição rara e atualmente estima-se que afete entre 0,5 e 1% da população mundial, com importantes variações regionais (FASANO et al., 2003 e CATASSI et al., 1996).

Em 1997, Dieterich e colaboradores demonstraram que a enzima transglutaminase era na realidade o principal auto antígeno da DC, revolucionando o conhecimento acerca da patogenia da doença e permitindo o desenvolvimento da técnica sorológica que permitia identificar anticorpos contra essa enzima (DIETERICH et al, 1997).

### 1.1.2 Definição

A doença celíaca (DC) é 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 nutrientes. (PENNA; MOTA; FAGUNDES, 1991). A doença pode atingir pessoas de qualquer idade (WALKER e MURCH, 1999) e sua manifestação depende não só do uso de glúten na dieta, mas também, da presença de fatores genéticos, imunológicos e ambientais (KOTZE, 1998; GUEVARA, 2002).

A doença manifesta-se principalmente nos primeiros dois anos de vida, sendo o intestino delgado o principal órgão afetado, com manifestações clínicas de diarreia, vômitos e emagrecimento e se apresenta das seguintes formas clínicas: (WALKER; MURCH, 1999). Na forma clássica da DC, as manifestações são gastrointestinais e começam entre 6 e 24 meses de idade, após a introdução do glúten na dieta. Tipicamente, as crianças apresentam diarreia crônica, distensão abdominal, hipotrofia muscular, irritabilidade. Nos casos com grave má-absorção intestinal ocorre a desnutrição. A crise celíaca é caracterizada por diarreia aquosa explosiva, distensão abdominal importante, desidratação, desequilíbrio eletrolítico, hipotensão e letargia, porém, raramente é observada (GREEN; CELLIER, 2007)

A doença celíaca com sintomas não clássicos, tem tendência a um início mais tardio dos sintomas, acomete crianças geralmente entre 5 e 7 anos. Estas podem apresentar queixas intestinais, dor abdominal recorrente, náuseas, vômitos, sensação de peso no epigástrico e no hipocôndrio e constipação, no entanto, as manifestações extra intestinais são predominantes, e podem ser explicadas pelos déficits nutricionais ou por reações imunológicas acometendo outros órgãos. Está bem estabelecido que a baixa estatura pode ser a única manifestação clínica da doença celíaca (BUSHARA, 2005).

Outras manifestações não clássicas da doença celíaca são a anemia ferropriva sem causa aparente e resistente à reposição de ferro, defeitos do esmalte dentário, estomatite aftosa recorrente e elevação das transaminases. Dermatite herpetiforme, uma doença vesiculosa da pele, é considerada até o momento como uma variante da

doença celíaca que raramente afeta a população pediátrica (TRONCONE; GRECO; AURICCHIO,1996; HILL et al, 2002).

A DC assintomática é encontrada em indivíduos que apresentam sorologia positiva e padrão histológico idêntico à forma clássica, com atrofia parcial ou subtotal da mucosa intestinal e que respondem à dieta isenta de glúten (CATASSI et al, 1996).

### 1.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico de DC deve ser baseado em três pilares: o exame clínico, por meio de exame físico e anamnese detalhada, além da análise histopatológica do intestino delgado, e dos marcadores séricos (CATASSI,1994; WETIZ et al, 2003). O diagnóstico final deve sempre basear-se na biópsia (ROMALDINI, BARBIERI ,1999; ROESSLER et al., 2001), a qual revela a mucosa anormal do intestino delgado proximal, com as vilosidades atrofiadas ou ausentes, aumento no comprimento das criptas e no número de linfócitos intra epiteliais (GUEVARA, 2002). O diagnóstico, muitas vezes, é difícil, devido ao grande número de casos atípicos da doença (RAUEN, BACK, MOREIRA, 2005).

### 1.1.4 Tratamento

O tratamento da DC consiste na dieta isenta de glúten de forma permanente, devendo-se, portanto, excluir da dieta os seguintes cereais e seus derivados: trigo, centeio, cevada, malte, aveia durante toda a vida, tanto nos indivíduos sintomáticos, quanto nos assintomáticos (POLANCO, 1996; SDEPANIAN; MORAIS; NETO, 2001; ROESSLER et al., 2001).

A dieta leva à remissão dos sintomas e restauração da morfologia normal da mucosa (GUEVARA,2002; LANDABURO; PÉREZ, 2002).

O glúten, presente nestes cereais deve ser substituído pelo milho, arroz, batata e mandioca, sendo considerados alimentos permitidos os grânulos, gorduras, óleos e azeites, legumes, hortaliças, frutas, ovos, carnes e leite, lembrando sempre que a dieta deverá atender às necessidades nutricionais de acordo com a idade do indivíduo (MORAIS; SDEPANIAN; NETO, 2001).

Além da dieta, o paciente celíaco deve estar atento também à composição dos medicamentos prescritos para ele (SDEPANIAN et al, 2001).

Os sintomas, por sua vez, podem reaparecer nos casos de não aderência à dieta ou por ingestão involuntária de alimentos contaminados com glúten (ABDULKARIM et al, 2002; LEFFLER et al, 2007).

Quanto maior o grau de conhecimento da doença e de seu tratamento, maior a obediência à dieta desprovida de glúten (SDEPANIAN; MORAIS; NETO, 2001).

#### 1.1.5 Estudos Epidemiológicos da doença celíaca

O perfil epidemiológico da doença celíaca é variável entre as diversas regiões do mundo e refletem vulnerabilidade genética e fatores ambientais de cada população (BRANDT; SILVA, 2008).

Estudos realizados, principalmente na Europa e nos Estados Unidos, indicam que a DC ocorre em torno de 0,5% a 1% da população geral. Ainda hoje, são poucos os estudos de prevalência da DC na América do Sul. A maioria dos trabalhos foi realizada na Europa, onde as condições sociais e ambientais são muito diferentes (DUBÉ et al, 2005; FASANO et al, 2003).

A prevalência da doença é muito variável de país para país (LANDABURO, PÉREZ, 2002), sendo desconhecidos dados estatísticos oficiais no Brasil. Atinge predominantemente os indivíduos de cor branca, mas no Brasil, devido à alta miscigenação racial, já foi descrita em mulatos (KOTZE, 1998).

Em 2000, foram publicados os primeiros estudos sobre prevalência da doença celíaca na América do Sul, tendo o primeiro sido realizado no Brasil (GANDOLFI et al, 2000; GUANDALINI, 2000). Em 2006, Melo e colaboradores observaram entre doadores de sangue, em Ribeirão Preto, prevalência estimada de doença celíaca de 1:273. Em 2007, Oliveira e colaboradores encontraram em população semelhante, prevalência de 1:214 na cidade de São Paulo.

Estudos realizados com crianças com síndrome de Down confirmaram o aumento da prevalência de doença celíaca entre esses pacientes, já relatada por vários estudos desenvolvidos na Europa, América do Norte e Argentina (BONAMICO et al, 2001; RUMBO, 2002).

A prevalência de doença celíaca na população em geral nesses países varia de 1:200 a 1:2.000 e entre pacientes com síndrome de Down pode ser de 20 a 200 vezes maior. 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 (GANDOLFI et al, 2000; NISIHARA et al, 2005).

O alto grau de associação de doença celíaca com síndrome de Down ainda não foi totalmente esclarecido, no entanto, os portadores dessas afecções frequentemente apresentam disfunções imunológicas, ficando predispostos às doenças autoimunes, tais como doenças da tireoide, diabetes melitus tipo 1, lúpus e artrite (ANWAR; WALTER; FRIER, 1998; BAKKALOGLU et al, 1994; OLSON et al, 1990; RUBELLO et al, 1995).

Segundo o anexo do Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da doença celíaca da Portaria nº 307, de 17 de setembro de 2009 relata que estudos de prevalência da doença celíaca têm demonstrado que é mais frequente do que anteriormente se acreditava e continua sendo subestimada. Estudos revelam que o problema atinge pessoas de todas as idades, mas compromete principalmente crianças de seis meses a cinco anos apresentando ou com frequência maior entre mulheres, na proporção de duas mulheres para cada homem e é predominante entre os indivíduos faiodérmicos (mestiços), embora existam relatos de sua ocorrência em indivíduos melanodérmicos (negros) (FASANO, CATASSI, 2001; PEREIRA et al., 2006).

O caráter hereditário desta doença torna imprescindível que parentes de primeiro grau de celíacos submetam-se ao teste para sua detecção (BRASIL, 2009).

A falta de informação sobre a doença celíaca e a dificuldade para o diagnóstico prejudicam a adesão ao tratamento e limitam as possibilidades de melhora do quadro clínico (BRASIL, 2009).

A partir de dados epidemiológicos da doença celíaca, se identifica o risco da ingestão do glúten a pacientes suscetíveis, verifica a grande importância das práticas de saúde pública através da vigilância sanitária ajudando na ação de promoção e prevenção à saúde desta população específica, os celíacos.

## 1.2 GLÚTEN

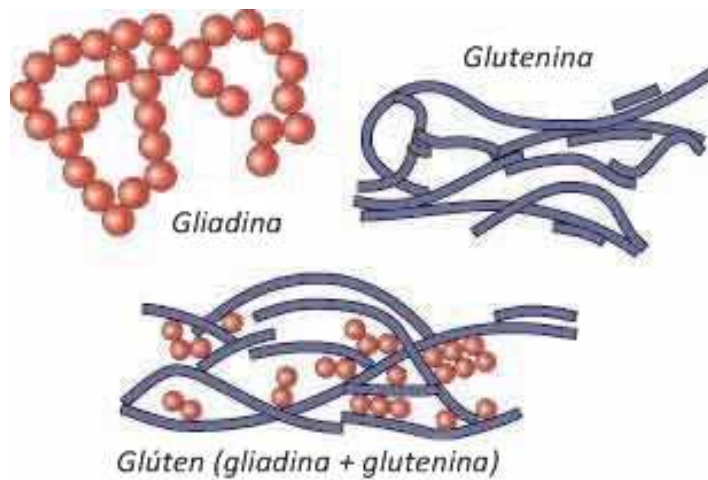
O trigo é um dos cereais com grande importância tecnológica devido a sua capacidade única de formação da rede de glúten, que confere extensibilidade e elasticidade às massas, sendo essencial para produção de alguns produtos, tais como, pães, bolos, biscoitos, massas alimentícias, entre outros é o mais consumido do mundo (SCHREUER et al. 2011).

O grão de trigo tem sua estrutura dividida em três partes: pericarpo (13-17%), o endosperma (80-83%) e o germe (2,0-3,5%), e possui diversos nutrientes como amido, fibras e proteínas. O endosperma é onde está concentrada a maior parte das proteínas do cereal, além do amido, e é a porção utilizada para a fabricação de farinha (POMERANZ, 1987; CORNELL, 2003; TOSI et al., 2011). Ele é formado por um tecido de células poligonais e irregulares repletas de grânulo de amido e de glúten (BEUX, 1997).

Na farinha de trigo existem dois tipos de proteínas: as não formadoras de glúten, albuminas e as globulinas, e as formadoras de glúten, gliadina e gluteninas, como mostrada na figura 1 a). As albuminas e as globulinas do ponto de vista tecnológico não são muito interessantes, pois não contribuem com características importantes que afetem a qualidade dos produtos de panificação. A gliadina e gluteninas se combinam através de ligações de pontes de hidrogênio, ligações de Van der Waals e pontes de dissulfeto e formam uma parede proteica de glúten, como representado na figura 1b). Quando a farinha de trigo entra em contato com a água forma uma massa que pode, após a fermentação, reter gás e dar forma característica aos produtos de panificação. A propriedade do glúten é manter a estrutura da massa através da rede formada que retém o gás carbônico produzido pela fermentação, conferindo elasticidade e maciez em produtos que utilizam farinha. Além disso, é usado como espessante em molhos, enlatados e embutidos (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

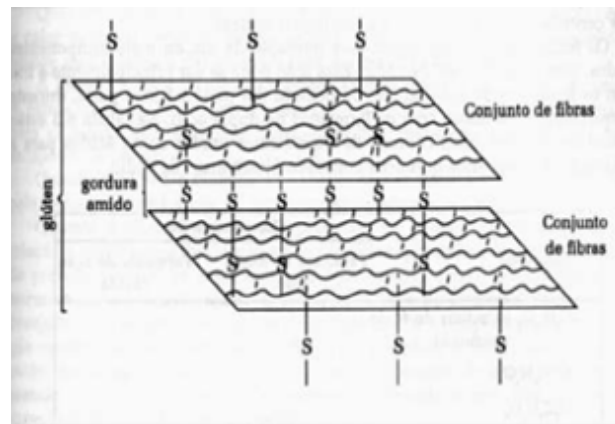
Figura 1 – Formação do glúten.

a) Representação da prolamina (gliadina e gluteninas)



Elaborado por: Quaglia, 1991.

b) Representação das ligações de pontes de hidrogênio, ligações de Van der Waals e pontes de dissulfeto



Elaborado por: Bobbio; Bobbio, 2001.

Além do trigo, o glúten corresponde à fração proteica dos grânulos centeio, cevada e aveia (WIESER, 2007) e, conseqüentemente, em todos os alimentos derivados e fabricados com estes cereais. As prolaminas são responsáveis pela toxicidade do glúten para pacientes celíacos (VADER 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 avenina (WIESER, 2007).

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 gordura (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 cevada (GUTIÉRREZ et al, 2004).

### 1.3 LIMITES ACEITÁVEIS DE GLÚTEN EM PRODUTOS

Os limites aceitáveis de glúten foram definidos através de estudos realizados com o objetivo de investigar os efeitos da ingestão de pequenas quantidades de gliadina por pacientes com doença celíaca. Os resultados sugeriram que das dosagens estudadas as quantidades de 10 e 50 mg de glúten por dia foram bem toleradas, mas que há uma tendência de ocorrerem mudanças na mucosa na dose de 50 mg (CICLITIRA et al, 1984.;CATASSI et al., 2005).

Os pacientes celíacos possuem respostas diferentes a toxicidade e imunogenicidade as prolamínas, a isto se deve a dificuldade em se estabelecer os limites aceitáveis de traços de glúten em amostras livres de glúten (STERN et al., 2001).

A alta prevalência da doença celíaca e a dificuldade de realizar uma dieta sem glúten pela população celíaca está diretamente relacionada à quantidade mínima de glúten que pode ser ingerida (SILVA, 2010). Os produtos direcionados ao consumo de populações mais vulneráveis a possíveis condições adversas à saúde, tais como os celíacos, demandam uma política de vigilância mais efetiva como: investir em conhecimento técnico, em novas metodologias de detecção de glúten para alimentos industrializados, execução destas metodologias no monitoramento destes como política preventiva e uma fiscalização efetiva do produto final, tanto para garantir a segurança alimentar quanto o direito à alimentação adequada e diversificada.



## 1.4 REGULAÇÕES

### 1.4.1 Regulações Internacionais de Alimentos para produtos contendo glúten

Nas últimas duas décadas, os órgãos internacionais de saúde têm mostrado preocupação com a qualidade dos alimentos e suas possíveis repercussões para a saúde dos consumidores, como também no comércio mundial de produtos alimentícios, seja *in natura* ou industrializados (GERMANO; GERMANO, 2008).

No âmbito internacional, a segurança alimentar é preconizada por organismos e entidades como o *CODEX Alimentarius* criado na década de 1960 pela Organização para Agricultura e Alimentos (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) para desenvolver normas, guias e recomendações de boas práticas para a produção e comércio de alimentos, tendo como principal finalidade a proteção à saúde da população, assegurando práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos, criando mecanismos internacionais dirigidos à remoção de barreiras tarifárias, fomentando e coordenando todos os trabalhos que se realizam em normalização (INMETRO, 2012).

No final dos anos 70, o *CODEX Alimentarius* começou a discutir recomendações para o limite de glúten culminando na Norma *CODEX* para Alimentos para Alimentação Especial de Pessoas com Intolerância ao Glúten (*CODEX STAN 118-1979*), este padrão foi adotado em 1979, alterado em 1983 e revisto em 2008.

Em 2007, mudanças foram realizadas no projeto da norma e publicadas como padrão oficial em 2008 (*CODEX*, 2008).

Na Norma *CODEX* para Alimentos para Alimentação Especial de Pessoas Intolerantes ao Glúten (*CODEX STAN 118-2008*), estabelece um novo limite de 20 miligramas por quilograma para produto constituído por alimento naturalmente livre de glúten e uma quantidade não superior a 100 miligrama por quilograma da mistura de dois ingredientes naturalmente livres de glúten e no alimento processado derivado de ingredientes fontes de glúten. Assim permitem que mercadorias como grânulos, legumes e sementes contenham uma pequena percentagem de outros grânulos, como resultado de contaminações durante a produção (*CODEX*, 2008).

Segundo a “Food and Drug Administration” (FDA) (U.S.A., 2014) os alimentos podem ser rotulados “sem glúten”, isto é, quaisquer grânulos que não sejam os grânulos que contém glúten: trigo, centeio, cevada, ou suas variedades híbridas,

podem ser rotulados como “sem glúten”, se ele se enquadra na definição, incluindo a presença de qualquer glúten inevitável devido à contaminação cruzada em quantidade menor que 20 ppm (mg/kg) e em conformidade com o padrão estabelecido pela Comissão do CODEX Alimentarius em 2008. A intenção da proposta do FDA é realizar uma avaliação de segurança para a exposição ao glúten para pessoas com doença celíaca, apesar de ser uma ação voluntária a rotulagem “sem glúten” ou um logo por parte do fabricante. Os produtos abrangidos são todos os alimentos regulamentados pela FDA, incluindo suplementos alimentares exceto carnes, aves e de determinados produtos de ovo regulamentado pelo USDA, Departamento de Agricultura dos EUA e da Secretaria de Fiscalização do Comércio do Álcool e do Tabaco (TTB).

Na Austrália, onde as exigências são mais rigorosas, métodos de teste atuais podem medir o nível de glúten em alimentos até menos de 3 partes por milhão (< 3ppm). Assim, neste país, alimentos anunciados como sendo “sem glúten”, exibindo o símbolo do grão cruzado não devem conter glúten detectável. Alimentos alegando ter baixo teor de glúten devem ter glúten em níveis inferiores a 20 mg de glúten por 100 g de alimentos (200 ppm) (Food Standards Australia New Zealand and CODEX Standards Issue 103, Standard: 1.2.8 *Clause 16, 2008*).

O Conselho de Alimentação e Mantimentos australiano (AFGC) propõe que o Food Standards Austrália New Zealand (FSANZ) altere a definição de “sem glúten” na Austrália. O AFGC quer que o FSANZ considere que um alimento contendo até 20 miligramas de glúten por quilograma possa ser rotulado “sem glúten”. Isso colocaria a norma australiana de classificação dos alimentos “sem glúten” em conformidade com as normas britânicas e europeias. Alguns argumentam que 10 miligramas por quilograma seria mais seguro para celíacos (LEDERMAN, 2013).

A nova legislação Europeia, após um período de transição de três anos, entrou em vigor em 2012 estabelecendo dois limites adequados ao grau de intolerância ao glúten de consumidores afetados pela doença celíaca. Estes limites cumprem as normas adotadas pela Comissão do CODEX Alimentarius adotadas em julho de 2008 (EUROPEAN UNION, 2009).

No Canadá, a Food and Drug Regulation (CANADA, 2012) define que a alegação sem glúten é qualquer representação em rótulos e na publicidade que declare, sugira ou implique que um alimento é livre de glúten, que são administrados pelo Ministério da Saúde do Canadá. O Canadá também segue os limites estabelecidos pelo CODEX Alimentarius.

No mundo, somente o Japão e a Suíça contemplam casos de contaminação cruzada em suas legislações e em outros países não se tem o controle nestes casos. (JOHNSON et al, 2011).

Em relação ao amido, na legislação Argentina, a partir de 4 de novembro de 2002, a Comissão Permanente de Estudo e Atualização do Regulamento de Inspeção de Produtos, Subprodutos e Derivados de Origem Animal, não permite em presuntos, paletas e lombos, a adição de substâncias amiláceas e nem mesmo proteínas isoladas de soja (PEDROSO, DEMIATE, 2008). Um dos argumentos da legislação Argentina é com relação ao consumo de presunto por celíacos, pela possibilidade da presença de glúten no presunto adicionado de amido de trigo, muito comum naquele país.

#### 1.4.2 Regulações Nacionais de alimentos para produtos que contém glúten

O Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969 que institui as normas básicas de alimentos no Brasil define rótulo como qualquer identificação impressa ou litografada, bem como os dizeres pintados ou grafados a fogo, por pressão ou declaração, aplicados sobre o recipiente, vasilhame, envoltório, cartucho ou qualquer outro tipo de embalagem do alimento ou sobre o que acompanha o continente (BRASIL, 1969). Este decreto tem em seu conteúdo mais atualizado e detalhado pela Resolução RDC Nº 259, de 20 de setembro de 2002, da ANVISA/MS. Dessa maneira o rótulo é o primeiro contato do consumidor com o produto que está sendo adquirido e consumido, portanto, é imprescindível que não exista ilusões e falsas imagens construídas em função das informações oferecidas por este (BRASIL, 2002b).

A Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998, de alimentos para grupos populacionais específicos, além das normas de rotulagem em geral, deve atender às necessidades fisiológicas pertinentes como os alimentos para dietas, como restrição de proteínas que são aquelas especialmente elaborados para atender às necessidades de portadores de erros inatos do metabolismo, intolerâncias, síndromes de má absorção e outros distúrbios relacionados à ingestão de aminoácidos e/ou proteínas. Estes produtos devem ser totalmente isentos do componente associado, como o glúten, portanto, há a necessidade de que a descrição no rótulo seja fidedigna comprovando a autenticidade do produto (BRASIL, 1998a).

A Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990, o código de defesa do consumidor reforça e amplia os preceitos do Decreto-lei Federal nº 986 de 21 de outubro de 1969, considerando-se que o rótulo constitui uma representação do produto, tendo em vista o conteúdo do seu artigo 30: Toda informação ou publicidade, suficientemente precisa, veiculada por qualquer forma ou meio de comunicação com relação a produtos e serviços oferecidos ou apresentados, obriga o fornecedor que a fizer veicular ou dela se utilizar e integra o contrato que vier a ser celebrado (BRASIL, 1990a).

No artigo 31 descreve: A oferta e apresentação de produtos ou serviços devem assegurar informações corretas, claras, precisas, ostensivas e em língua portuguesa sobre suas características, qualidades, quantidade, composição, preço, garantia, prazos de validade e origem, entre outros dados, bem como sobre os riscos que apresentam à saúde e segurança dos consumidores (BRASIL, 1990a).

No Brasil, em virtude das dificuldades para garantir a prática da dieta isenta de glúten foi promulgada, em 1992, a Lei Federal Nº 8. 543, que determina a impressão da advertência “contém glúten” nos rótulos e embalagens de alimentos industrializados que apresentem em sua composição derivados do trigo, centeio, cevada e aveia. Assim, os portadores de doença celíaca podem identificar os alimentos que não devem consumir. No entanto, as embalagens dos produtos que não o contém, não necessitam, segundo a mesma Lei, virem acompanhadas dos dizeres não contém glúten e, obviamente, podem ser consumidos pelos celíacos. (BRASIL, 1992).

A RDC Nº40, de 08 de fevereiro de 2002 em seu anex o 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” (BRASIL,2002a); o mesmo é disposto na RDC Nº259 de 20 de setembro de 2002 que prevê nova rotulagem para alimentos com glúten (BRASIL, 2002b).

Atualmente, a regulamentação que vigora é a Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003, reforça o código do consumidor quando se preocupa com o riscos que advém de má informação dos rótulos à saúde do consumidor obrigando que todos os alimentos industrializados deverão conter em seus rótulos e materiais de divulgação as inscrições “contém glúten” ou “não contém glúten”, conforme o caso, obrigando as indústrias alimentícias a informar nas embalagens de qualquer alimento a presença

ou não de glúten de forma clara e padronizada, utilizando como medida preventiva e de controle da doença celíaca (BRASIL, 2003a).

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 a 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 aos portadores de Doença Celíaca ou Síndrome Celíaca: contém Glúten” ou Atenção: Este medicamento contém Glúten e, portanto, é contraindicado para portadores de Doença Celíaca ou Síndrome Celíaca (BRASIL, 2003b).

Foi discutida em Consulta pública Nº 29 de 05 de junho de 2014, a mudança de informações nos rótulos de alimentos, a proposta em análise foi que a quantidade de glúten no alimento mude para inferior a 20 partes por milhão (mg/kg) para que haja a declaração "não contém glúten" nos rótulos, entre outros fatores. Contudo, estudos científicos mostram que um limite menor é mais seguro para os celíacos (BRASIL, 2014).

A FENACELBRA (Federação Nacional das Associações de Celíacos do Brasil) pleitearam, através de campanhas, o limite máximo de 10 partes por milhão (mg/kg) de glúten para que os alimentos se enquadrem na categoria "livre de glúten" e possam ser consumidos sem risco pelas pessoas com doença celíaca (FENACELBRA, 2014).

A proposta de rotulagem atende solicitação da Associação de Celíacos do Brasil (ACELBRA), com sede em São Paulo, cujo objetivo é proteger pessoas que sofrem de Síndrome Celíaca, mas ainda não é a solução. Ainda se encontra um número reduzido de produtos oferecidos para população celíaca, principalmente fora dos grandes centros urbanos, o que dificulta o seguimento da dieta (ALCEBRA, 2014).

Em relação ao amido, a legislação Brasileira não permite a adição de amido em nenhum tipo de presunto, ao contrário de países como Japão e os Estados Unidos, cujos presuntos com alta qualidade apresentam este ingrediente em sua formulação (PEDROSO, DEMIATE, 2008). A legislação brasileira permite, por meio da Portaria 1004 de 1998 (BRASIL, 1998), uma série de polissacarídeos para a utilização em produtos cárneos. O amido não é considerado um aditivo e não há diferenciação entre nativo e modificado. Apesar de o presunto não poder conter o amido em sua composição, diversos outros produtos cárneos similares comumente apresentam este

ingrediente, como apesuntados e produtos de massas finas, mortadelas e salsichas. (BRASIL, 1998b).

### 1.5 AÇÕES DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA E SEGURANÇA ALIMENTAR

Os grandes avanços e inovações tecnológicas tem proporcionado uma oferta muito grande de produtos alimentares, entretanto, se, por um lado este desenvolvimento traz muitos benefícios como aumento da produção, conservação, diversificação, transformação da matéria-prima alimentar em produtos adequados ao consumo humano, atendimento às necessidades nutricionais específicas, por outro lado, pode trazer problemas decorrentes dessa modernização, quando estes produtos são processados, como contaminação de natureza técnica ou fraudulenta, alteração da composição nutricional e/ou deterioração dos alimentos, comprometendo a inocuidade do produto e sendo prejudicial à saúde do consumidor (SPERS; KASSOUF, 1996; WHO, 1991; GERMANO; GERMANO, 2008).

Desde a Segunda Guerra Mundial, a sociedade e o poder público passaram a se preocupar com a luta contra a fome e a concepção de um estado de segurança alimentar e bem-estar nutricional, visando à saúde do consumidor. A promissora emergência de ideias e estatutos resultou no movimento que busca praticar a segurança alimentar como um referencial obrigatório dos direitos de cidadania (BATISTA, 2003).

A definição de segurança alimentar estabelece limites e prioridades para as políticas sociais, considerando que a saúde tem como fatores determinantes e condicionantes, a alimentação e serviços essenciais à saúde, dentre outros, quando diz: “a alimentação saudável e adequada é direito de todos e a saúde é um direito fundamental do ser humano, devendo o Estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício (BRASIL, 1988).

A Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006 complementa, a segurança alimentar e nutricional é a garantia do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente e de modo permanente, com base em práticas alimentares saudáveis e respeitando as características culturais de cada povo, manifestadas no ato de se alimentar. Dentre os objetivos da segurança alimentar estão listados a disponibilidade de alimentos de qualidade, originados de formas produtivas eficientes, e a divulgação de informações ao consumidor sobre

práticas alimentares saudáveis e possíveis riscos à saúde, mediados pelo alimento. Na mesma lei, o artigo quarto incisos III e V afirma: a segurança alimentar e nutricional abrange a promoção da saúde, da nutrição e da alimentação da população, incluindo-se grupos populacionais específicos e populações em situação de vulnerabilidade social e a produção de conhecimento e o acesso à informação. A produção de conhecimento e a informação faz parte das políticas públicas de saúde com o objetivo de minimizar um número crescente de doenças causadas por alimentos contaminados podendo realizar monitoramento destes a partir do controle da qualidade efetivo de toda a cadeia alimentar, desde a produção, armazenagem, a distribuição até o consumo do alimento *in natura* ao processado, bem como os processos de manipulação que se fizerem necessários (CAVALLI, 2001; ALMEIDA et al, 2006; GERMANO; BOANOVA; GERMANO, 2009).

A segurança, dos alimentos que ingerimos, está interligada com muitas outras questões relacionadas aos modernos métodos de agricultura e ao uso de agroquímicos como conservantes, pesticidas e fertilizantes. Um alimento disponível para o consumo da população deve garantir um consumo seguro ou produtos livres de contaminantes de natureza química, biológicas, física ou de outras substâncias que possam colocar em risco a população (SPERS; KASSOUF, 1996).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde em países industrializados, anualmente, mais de 30% das doenças são de origem alimentar (WHO, 2002).

Segundo Eiroa (1989), as toxinfecções alimentares, enfermidades causadas pela ingestão de alimentos contaminados e/ou substâncias tóxicas, constituem importante problema sanitário cujo dimensionamento é dificultado no Brasil pela não obrigatoriedade de notificação de surtos.

Alimentos são produtos sujeitos ao controle sanitário devido ao impacto que causam sobre a saúde, tanto pela sua qualidade intrínseca como pelo seu consumo inadequado (STRINGHETA et al., 2006).

A Lei Nº 8.080 de 19 de setembro de 1990, conhecida como a “Lei Orgânica da Saúde”, dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, garantindo o acesso universal e igualitário a todas as ações e serviços nesta área (BRASIL, 1990b).

Na fiscalização de alimentos tem como ponto fundamental o estabelecido pelo Ministério da Saúde em 1993, a partir da Portaria nº 1.428 que editou diretrizes e

princípios para a inspeção sanitária, preconizando a adoção dos métodos de Boas Práticas de Produção em todos os estabelecimentos de produção e comercialização de alimentos e afins, e assegurando o controle de qualidade dos alimentos pela Análise de Perigos em Pontos Críticos de Controle (APPCC) (BRASIL, 1993).

As práticas de Vigilância sanitária se estabelecem com base no conceito de risco, perigo virtual ou ameaça de agravo, relacionado com determinados elementos que o homem aprendeu a identificar na experiência cotidiana. Antes mesmo da medicina científica e do desenvolvimento da epidemiologia e, conseqüentemente, da elaboração do conceito de risco, estabeleciam-se normas visando proteger a saúde da coletividade (COSTA, 2004).

O termo risco no sentido epidemiológico diz respeito à probabilidade de ocorrência de eventos adversos relacionados a objetos submetidos a controle sanitário. O risco pode ser encarado como possibilidade ou probabilidade de ocorrer um perigo ou ameaça. Como perigo ou ameaça, qualquer propriedade biológica, química ou física de um alimento que cause danos inaceitáveis para a saúde do consumidor (ROZENFELD, 2009).

O risco é um objeto social, como afirma Veyret (2007): “Não há risco sem uma população ou indivíduo que o perceba e que poderia sofrer seus efeitos. Correm-se riscos, que são assumidos, recusados, estimulados, avaliados, calculados. O risco é a tradução de uma ameaça, de um perigo para aquele que está sujeito a ele e o percebe como tal”.

Segundo Rosenfeld (2009), a Lei N° 8.080 de 1990, que define Vigilância Sanitária, introduziu o conceito de risco e confere um caráter mais completo ao conjunto das ações, situando-as na esfera de produção, harmonizando melhor com o papel do Estado, em sua função reguladora da produção econômica, do mercado e do consumo, em benefício da saúde humana. Embora as definições e interpretações sejam numerosas e variadas, todos reconhecem no risco a incerteza ligada a um momento futuro, num tempo em que o risco se revelará.

Caso identificados os riscos, é preciso empreender ações de controle como fiscalizações, uso de legislações pertinentes ao assunto, comunicação e educação sanitária, acessar os sistemas de informação, o monitoramento da qualidade de produtos e serviços e outros.

O monitoramento, que significa controlar mediante acompanhamento ou observar com propósito especial, se incorporou ao campo da Saúde Pública através



da área de cuidados intensivos à saúde, como coleta sistemática de informações, para alertar quanto à necessidade de intervenção e deveria funcionar como ação preventiva à saúde da população.

As análises previstas por lei fornecem subsídios aos órgãos fiscalizadores e completam o conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde. A avaliação laboratorial como um dos conjuntos de ações deverá confirmar suspeitas, ou dirimir dúvidas, da fiscalização, quanto à qualidade mínima do produto, ou da matéria prima, estabelecida por lei. As análises previstas serão sempre um complemento à ação fiscalizadora (ROSENFELD, 2009).

Serão compreendidos como riscos à saúde os alimentos que contém glúten e que não tem esta informação declarada no rótulo, pois a sua ingestão é danosa à saúde de populações celíacas.

Segundo Shank e Carson (1994), o melhor sistema para proteger a saúde do consumidor abrange dois níveis de controle: o de responsabilidade da indústria, a produção de alimentos seguros; e o de responsabilidade das agências governamentais, o monitoramento que assegure que a indústria cumpra sua função.

Na esfera industrial, o controle sanitário, deve ter como objetivo a manutenção e a higiene das instalações, dos equipamentos e dos utensílios; o treinamento do pessoal técnico com acesso à linha de produção e os processos de industrialização propriamente ditos, sobretudo, os ingredientes e as substâncias químicas adicionadas durante a preparação dos alimentos (GERMANO; GERMANO, 2011), de forma a evitar a contaminação cruzada por glúten.

O termo contaminação cruzada, neste caso, se refere à presença inevitável de glúten em alimentos devido ao contato com um alimento que contém glúten.

A presença de glúten em um grão, leguminosa, ou semente que é naturalmente livre de glúten com este tipo de entrelaçamento é um exemplo de contaminação cruzada. A prática típica de rotação de culturas, bem como o uso compartilhado de equipamentos de colheita, transporte e silos de armazenagem, muitas vezes resulta em grânulos que contém glúten que entram em contato com outros grânulos, legumes e sementes que são naturalmente livres de glúten. Além disso, instalações de fabricação que utilizam equipamentos de produção compartilhados para produzir alimentos com e sem glúten podem causar contaminação cruzada. Mesmo os produtos voltados especificamente para o tratamento dietético da doença celíaca pode conter pequenas quantidades de proteínas do glúten, seja por causa da contaminação

cruzada de cereais, originalmente sem glúten, durante a moagem, armazenamento e manipulação ou por causa da presença de amido de trigo como ingrediente principal. É quase impossível manter uma dieta com um teor de glúten de zero devido a contaminação de glúten ser muito comum em alimentos. Glúten "escondido", usado como um agente de enchimento proteico, podem ser encontrados em produtos comercialmente disponíveis, tais como salsichas, sopas, molhos de soja e sorvetes (CATASSI et al, 1993).

## 1.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO GLÚTEN EM ALIMENTOS

A espectrometria de massa, a cromatografia líquida de alta resolução, eletroforese em gel de poliacrilamina, a análise de DNA (ácido desoxirribonucleico), e métodos imunológicos são métodos analíticos utilizados para detecção de glúten em alimentos. (SILVA, 2010; JOHNSON et al, 2011).

A cromatografia líquida de alta resolução é altamente específica, uma vez que tem como padrão as prolaminas dos cereais para comparação, este método tem sensibilidade e especificidade mais baixa quando comparados com os imunológicos, possuem custo mais elevado maior tempo de execução, e com frequência apresentam resultados não confiáveis quando o alimento for processado ou aquecido. A espectrometria de massa pode ser utilizada como método de triagem para a cromatografia líquida de alta resolução e o método de PCR (Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase) como método de confirmação, na detecção do DNA do trigo para a análise de alimentos onde o método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) não for conclusivo. 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. Atualmente, a técnica mais utilizada é o método ELISA, por apresentar baixo custo, fácil execução e resultados rápidos, quando comparada com as outras técnicas (SKERRITT e HILL, 1991; VALDÉS et al, 2003).

O método ELISA também chamado teste ou ensaio imunoenzimático é baseado na reação específica de anticorpos com os antígenos, no caso as proteínas e peptídeo os tóxicos aos celíacos (WIESER, 2007).

A Comissão do CODEX Alimentarius sugere o ensaio ELISA-R5 sanduíche de Mendez como o método Padrão I para análise de alimentos industrializados, sendo mais abrangente e sensível quando comparado com os outros métodos ELISA (THOMPSON; MENDEZ, 2008; SILVA, 2010), mas permite outros métodos relevantes, tais como o DNA.

O método ELISA-R5 é baseado no anticorpo monoclonal R5 que reconhece a sequência pentapeptídica tóxica QQFPF (glutamina-glutamina-prolina-fenilalanina-prolina) e que está presente em todas as frações  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\omega$  de gliadinas do trigo, secalinas da cevada e hordeínas do centeio, e possibilita a detecção de até 1,5 ppm de gliadina ou 3 ppm de glúten das prolaminas do trigo, cevada e centeio, atendendo o limite estabelecido pelo CODEX (THOMPSON; MENDEZ, 2008; DEUTSCH et al., 2008; SILVA, 2010). O ensaio utiliza gliadina padrão (IRM-480) e detecta glúten em alimentos contendo transglutaminase utilizada para o enriquecimento da farinha. 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).

O método ELISA-R5 sanduíche serve apenas para detecção de antígenos maiores, pois ele deve ter pelo menos dois epítomos com uma distância considerável, de forma que os antígenos possam se ligar a ele. Esse último ponto torna a análise ELISA-R5 sanduíche inviável para a detecção de glúten parcialmente hidrolisado, como em alimentos fermentados, com malte e cerveja (WIESER, 2008). Uma limitação de ELISA tipo sanduíche é não medir adequadamente a quantidade de prolaminas hidrolisadas. Quando a proteína de glúten foi hidrolisado ou dividida em fragmentos de proteína menores, os péptidos resultantes podem não conter dois epítomos ou locais de ligação de anticorpo. De acordo com o Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (WGPAT), essa técnica é mais indicada para medir a contaminação de glúten por proteínas intactas e seu diferencial é utilizar o padrão de gliadina desenvolvido pelo grupo WGPAT (THOMPSON; MENDEZ, 2008; DEUTSCH et al, 2008; SILVA, 2010).

A técnica PCR, amplifica parte de uma sequência específica de DNA permitindo o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucleicos e realiza, por meio de etapas de variação de temperatura, a duplicação de cadeias de DNA in vitro. A reação de amplificação de DNA por PCR envolve o uso dos quatro Nucleotídeos do DNA, sequências iniciadoras (primers) e uma DNA polimerase termoestável, sendo

possível a obtenção de muitas cópias de uma sequência específica de ácido nucléico, a partir de uma fita molde (MOLINA; TOBO, 2004; COSTA, 2009).

## 1.7 MICROSCOPIA DE ALIMENTOS

### 1.7.1 Histórico

Em 1850, Arthur Hassal demonstrou que com ajuda do microscópico era possível diferenciar o café moído da chicória. Com seu microscópico, Hassal pode identificar não só a chicória, mas também trigo tostado e outras matérias estranhas ao café. Escreveu artigos para a revista *The Lancet* durante o período de 1851 a 1854 com base em mais de 2.000 análises, refletindo não só o grau de adulteração entre alimentos e drogas, mas também avaliando se os produtos eram bons ou maus para o consumo e publicou um livro em 1855. Seus estudos provocaram um grande interesse e uma enorme preocupação pública que levaram a formação, no ano de 1860, do primeiro Ato Legislativo sobre alimentos e Drogas. Este Ato pretendia evitar a adulteração de alimentos e atribuindo aos analistas a tarefa de proporcionar os meios para isso (FLINT, 1996).

Em 1857, Hassal (HASSAL, 1857) publicou seu segundo livro *Adulterations Detected* em que dava instruções únicas para a detecção de fraudes em alimentos e medicina. O livro inclui recomendações para a eleição do microscópico e dos meios de montagem sensível para observar os detalhes morfológicos, nesta obra o único meio de coloração que se menciona é a solução de iodo. Os métodos eram rápidos, Hassal calculou que utilizando o microscópio para observar a estrutura dos tecidos e os testes químicos sensíveis para detectar os adulterantes inorgânicos, se podiam analisar cem amostras semanalmente.

Em 1909, Clayton fez a revisão e ampliou a segunda parte da publicação de Hassal relativa a microscopia (CLAYTON, HASSAL, 1909). Clayton incorporou coloração para gorduras e proteínas, descritas por Greenish (1903). Neste texto, Greenish inclui dados de medidas como ajuda para identificação de alimentos, indicando a categoria de tamanho dos grânulos dos amidos comerciais e a altura das células paliçada em legumes em pó. O livro de Greenish (1903) originou, em seguida, a obra "*Anatomical Atlas of Vegetable Powders*" (GREENISH, COLLI, 1904) com Colli como coautor, que ainda é utilizado nos dias de hoje.

A obra mais completa sobre a estrutura dos alimentos são quatro volumes ilustrados, escritos na década de 1930 por Winton e Winton (1932-1939).

Em 1923 inicialmente foi editado o livro “Analytical Microscopy” (WALLIS, 1923), que foi ampliado em 1957 e teve a terceira edição publicada em 1965, que serve de guia para analistas interessados em como utilizar melhor o microscópio para análises de alimentos, água, especiarias e drogas.

### 1.7.2 Definição e Aplicação

A análise microscópica de um produto alimentício tem como objetivos identificar os elementos histológicos que compõem o produto e isolar e identificar matérias estranhas ou sujidades. A análise histológica visa garantir ao consumidor adquirir produtos que contenham os ingredientes declarados no rótulo, enquanto na análise de matérias estranhas, a ausência destas ou baixos níveis para alguns contaminantes indica que o alimento foi produzido atendendo as boas práticas de fabricação. A análise de identificação dos elementos histológicos vegetais permite constatar a identidade do produto e detectar fraudes. A identidade pode ser definida como os constituintes característicos do produto que estão declarados no rótulo, enquanto fraudes são os elementos estranhos ao produto (RODRIGUES et al, 1999).

A microscopia de alimentos tem como finalidade o estudo e a identificação de espécies vegetais empregadas na elaboração de produtos alimentícios tecnologicamente processados. Trata-se de uma ciência aplicada que emprega conhecimentos de botânica (morfologia, anatomia e taxonomia), de química analítica e de entomologia. Segundo Menezes (1949), a histologia característica para cada substância propicia ao microscopista a identificação do produto e a avaliação do grau de pureza do mesmo.

A identificação e avaliação microscópica de ingredientes ou misturas que os contenham, são efetuadas principalmente por meio de dois métodos distintos: a observação das características macroscópicas ou microscópicas. O primeiro método é o mais usado, requerendo pouca preparação da amostra e depende basicamente da habilidade do analista em identificar os constituintes, pela sua forma, cor, tamanho da partícula, textura, dureza, brilho, odor, sabor, e outros. O outro método depende do conhecimento da estrutura celular de tecidos animais e vegetais. Ambos podem

ser usados independentemente, embora os melhores resultados sejam obtidos com a sua combinação (AAFMM, 1978).

Segundo Olga Flint, os ingredientes dos alimentos e dos produtos alimentícios se tem estudado essencialmente mediante análises químicas, contudo, a microscopia se utiliza desde há muito tempo como ferramenta a avaliação da qualidade dos alimentos (FLINT, 1996).

Para a análise microscópica se utiliza o instrumento de óptica que nos dá a imagem aumentada do objeto. Quando constituído por apenas um sistema de lentes é considerado simples; por dois ou mais sistemas de lentes chamado composto. Neste instrumento geralmente se usam preparados corados, que são observados por transluminação. A sequência dos raios luminosos desde a fonte de luz até o olho do observador começa no condensador projetando um raio de luz sobre o objeto; a objetiva projeta uma imagem aumentada do objeto, em direção à ocular, que novamente amplia a imagem e a projeta sobre a retina, sobre a tela ou sobre a chapa fotográfica. A ampliação total dada por uma combinação de lentes é igual ao aumento da objetiva multiplicado pelo aumento da ocular. A nitidez e riqueza de detalhes da imagem é dada pelo limite de resolução do sistema óptico do microscópio, esta propriedade depende da objetiva. O limite de resolução de um sistema óptico, sua capacidade de separar detalhes, é a menor distância que deve existir entre dois pontos para que apareçam individualizados (BRADBURY, 1989).

Um outro instrumento que é utilizado na microscopia, principalmente na identificação de amido é o microscópio de polarização. O microscópio de polarização é um microscópio composto de platina rotatória, à qual foram acrescentados dois polarizadores: um localizado abaixo da platina, polarizador, e outro, acima dela, junto à ocular, analisador. Polarizador e analisador estão colocados de tal maneira que suas seções principais estão cruzadas, isto é, se cortam perpendicularmente. Nessas condições, o observador não vê nenhuma luz na ocular, chamado de campo escuro. Quando se coloca na platina um corpo amorfo, essa situação não se altera, porque a luz não sofre modificação. O contrário se dá quando observamos um corpo cristalino ou birrefringente. Dependendo da orientação desse corpo na platina, a luz brilha com maior ou menor intensidade. O microscópio de polarização serve, pois para distinguir as substâncias monorretríngentes das substâncias birrefringentes. Podem também estudar perfeitamente estruturas duras de tipo cristalino ou semicristalino como tecido

ósseo, dentes, cutículas dos invertebrados, formação celulósica, como madeira e estruturas de simetria linear, como as fibras colágenas, fibras musculares, fibras nervosas, fibrilas intracitoplasmáticas, cílios, flagelos, estruturas de sistema radiaria, como os grânulos de amido e as gotículas lipídicas (BRADBURY, 1989).

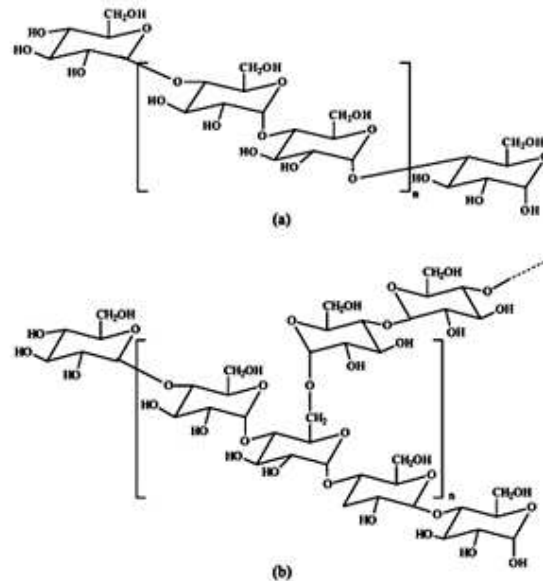
A preparação para o exame microscópico visa facilitar a visualização das partículas e pode obedecer os seguintes processos: separação por peneiramento ou tamisação, flotação, remoção de gordura, quantificação (HUSS, 1975; KHAJARERN et al, 1987).

A microscopia constitui um método rápido, efetivo, , dispensa equipamentos de alto custo, excelente ferramenta para auxiliar na análise laboratorial, proporcionando uma informação que complementa a fornecida pelas análises físicos e químicos. Ao mostrar a distribuição e o estado físico dos constituintes, particularmente dos amidos, o microscópico óptico fornece uma explicação visual de como os alimentos com composição química similar possuem estruturas muito diferentes. Utilizada cada vez mais para estudar a influência dos ingredientes e as condições de processado na estrutura dos alimentos (FLINT, 1996).

## 1.8 AMIDO

O amido é um polissacarídeo formado por dois tipos de polímeros de glicose: a amilose e a amilopectina, com estruturas funcionais diferentes. A amilose é uma molécula linear com unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídias  $\alpha$ -1,4, com grau de polimerização de 200 a 3000, dependendo da fonte de amido. A amilopectina é uma molécula mais abundante nos diferentes tipos de amido, é um polímero maior, altamente ramificado, com, em média, 10.000 – 100.000 unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 e nos pontos de ramificação unidas por ligações  $\alpha$ -1,6, as quais ocorrem a cada 20-25 unidades de glicose (FRENCH, 1973; GUILBOT; MERCIER, 1985).

Figura 2: Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b)



Elaborado por: Corradini, E. et al, 2005.

O amido de milho contém cerca de 27% de amilose e 73% de amilopectina, no trigo 26% de amilose e 74% de amilopectina, na mandioca 17% de amilose e 83% de amilopectina.

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 (FRENCH, 1973; GUILBOT; MERCIER, 1985). 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 processados (GALLANT, 1992). O amido de milho (*Zea mays L., Poaceae*), amido de arroz (*Oryza sativa L., Poaceae*), amido de trigo (*Triticum aestivum L., Poaceae*), amido de mandioca (*Manihot utilissima Pohl, Euphorbiaceae*) e amido de batata (*Solanum tuberosum L., Solanaceae*) são considerados oficiais pela Farmacopeia Brasileira, 2010.

De todos os polissacarídeos, o amido é o único produzido em pequenos agregados individuais, denominados grânulos, acumulando-se nos cloroplastos



durante o processo de fotossíntese, servindo como fonte principal para a síntese de sacarose citosólica durante a noite, auxiliando o metabolismo e crescimento da planta. Essa sacarose é então transportada para os órgãos de armazenamento das plantas, como sementes, frutas, tubérculos e raízes, sendo formado nos plastídeos ou plastos das plantas superiores (VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004; TESTER et al., 2004).

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, ou semicristalino, com graus de cristalinidade que variam de 20% a 45% (YOUNG, 1984). Além das diferenças na estrutura granular, têm-se as diferenças nas propriedades físico-químicas e na qualidade dos produtos finais (VAN HUNG, MAEDA, MORITO, 2006).

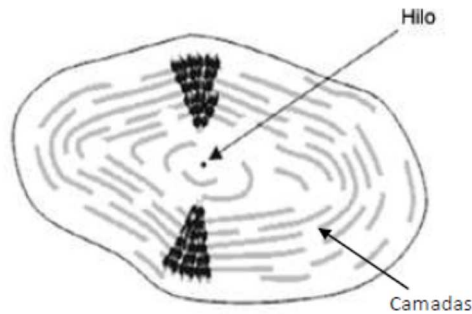
A cristalinidade do amido está relacionada com o componente amilopectina, o qual é radialmente orientado no grânulo, enquanto as regiões amorfas são principalmente representadas pela amilose (CAMERON; DONALD, 1992; RATNAYAKE; JACKSON, 2007). Variações nas proporções entre amilose e amilopectina podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais muito diferentes, que podem afetar as suas aplicações industriais. Existem no grânulo zonas de maior resistência à penetração da água e a hidrólise, indicando regiões em que há maior número de ligações entre as moléculas, formando camadas cristalinas (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

As camadas cristalinas e semi-cristalinas se superpõem ao redor de um ponto que é denominado “hilo ou hilum”, formam anéis de crescimento que em continua repetição, tornam-se progressivamente mais finos na medida em que avançam para o exterior do grânulo (KOOSMANN; LLOYD, 2000), podendo não ser vista em alguns grânulos de amido. Pelo carácter cristalino ou semicristalino, os grânulos de amido apresentam a birrefringência quando observados em microscópio óptico sob luz polarizada. A parte linear das moléculas de amilopectina forma estruturas helicoidais duplas, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre grupamentos hidroxila dando origem às regiões cristalinas dos grânulos. A região amorfa é composta pelas cadeias de amilose e pelas ramificações da amilopectina (SOUZA; ANDRADE, 2000).

O “hilum” ou hilo é considerado o ponto original de crescimento do grânulo, onde se inicia o processo de deposição de amido no aminoplasto (DENARDIN; SILVA,

2009; TESTER; KARKALAS; QI, 2004). A estrutura do grânulo de amido é apresentada na figura 3 com hilo e camadas, estrias ou lamelas.

Figura 3 Estrutura interna do grânulo de amido



Elaborado por: Parker e Ring, 2001.

Estas diferenças de quantidade de amilose e amilopectina do amido afetam a reação com o iodo. Na presença de água a grande estrutura helicoidal da amilose fixa o iodo dando uma cor azul intensa. As ramificações da molécula de amilopectina formam hélices muito curtas e os amidos serosos que não tem amilose apresentam o iodo uma cor avermelhada. Esta cor apresenta os amidos hidrolizados, dextrinas, que contem cadeias curtas de amilose. Por estas razões, o iodo é um reativo útil para a identificação de amidos com um alto teor de amilopectina, amidos céreos, e para o surgimento de mudanças que se produzam durante o cozimento (JANE et al, 1999).

### 1.8.1 Identificação dos grânulos de amido

Na análise microscópica devem ser observadas características como forma, presença de lamelas, tipo de hilo e estado de agregação, complexo com os polissacarídeos, principalmente amilose. As estrias aliadas ao tamanho e a forma dos grânulos, podem servir de meio de identificação microscópica da origem botânica do amido (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Para sua identificação os amidos ou féculas podem ser classificados: **1.** Quanto a forma: esféricos – discoides, globulares ou lenticulares; ovoides ou piriformes; poliédricos ou poligonais; elipsoidal; reniformes e truncados; **2.** Quanto a estrutura: homogêneos e estratificados; **3.** Quanto ao tipo de hilo: puntiforme; linear; cruciforme;

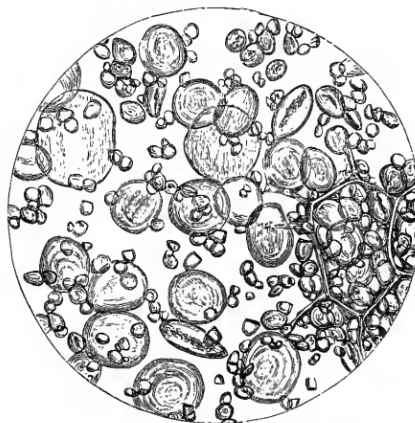
estrelado; circular; poliédrico; 4. Quanto ao estado de agregação: simples ou isolado; composto – agrupado, agregado ou composto (BEUX, 1997).

As características físicas dos grânulos de amido entre as quais a forma e tamanho, variam de acordo com a fonte botânica. Para cada cereal existe um tipo de amido com características específicas quando visualizadas microscopicamente. A posição e a forma do hilo são importantes na identificação do grão de amido, bem como a centralidade ou não das camadas concêntricas. As estrias não são tão evidentes em todos os amidos, mas a posição do hilo normalmente se pode ver em meios de montagem aquosos, apresentando-se como um ponto ou, às vezes, como uma ruptura em forma de estrela.

#### 1.8.2 Principais características microscópicas dos grânulos de amido em diferentes espécies vegetais

O amido de trigo apresenta dois tipos de grânulos: os maiores são lenticulares quando vistos de frente ou biconvexos quando vistos de lado, arredondados ou ovalados, com estrias pouco visíveis e hilo pontuado em raros grânulos (Figura 4). Os menores têm forma arredondada ou ligeiramente poligonal. Em média medem 20 a 30  $\mu\text{m}$  (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

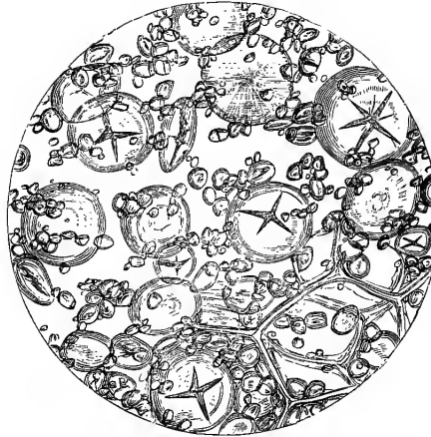
*Figura 4: Grânulo de amido de trigo.*



*Elaborado por: Clayton e Hassal, 1909.*

Amido de centeio (Figura 5) é constituído por uma mistura de grânulos muito pequenos e de grânulos um pouco maiores, de forma discoides, com hilo radiado (BEUX, 1997).

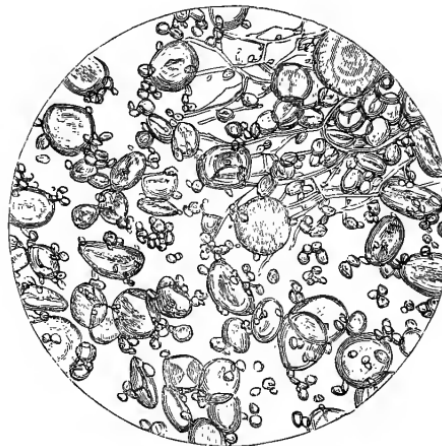
Figura 5: Grânulo de amido de centeio.



*Elaborado por: Clayton e Hassal, 1909.*

Amido de cevada (Figura 6) é constituído por grânulos de diversos tamanhos, forma lenticular, estrias distintas, com hilo linear (BEUX, 1997).

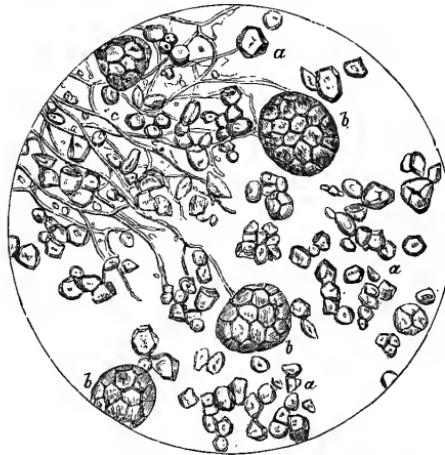
Figura 6: Grânulo de amido de cevada.



*Elaborado por: Clayton e Hassal, 1909.*

Amido de aveia é constituído por grânulos de amido ovais ou arredondados, compostos, de tamanho entre 35 e 45  $\mu\text{m}$  (Figura 7). Estes grânulos compostos resultam da aglomeração de 5 a 200 grânulos simples, corados com lugol tornam-se azul- violáceos (BEUX, 1997).

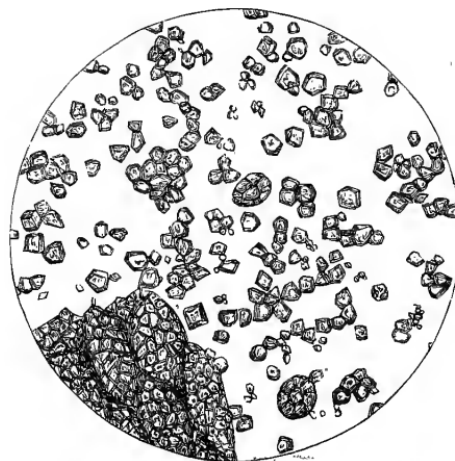
Figura 7: Grânulo de amido de aveia.



Elaborado por: Clayton e Hassal, 1909.

No amido de arroz (Figura 8) os grânulos são muito pequenos, poliédricos, com ângulos agudos e arestas retas, comumente reunidos em grupos, com diâmetro de 2  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  (4  $\mu\text{m}$  a 6  $\mu\text{m}$ , em média). Os grânulos arredondados são raros e o hilo frequentemente está ausente ou aparece como diminuta pontuação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 8: Grânulo de amido de arroz.



Elaborado por: Clayton e Hassal, 1909.

A fécula de batata os grânulos são simples, irregularmente ovóides ou subesféricos, raramente agrupados aos pares ou trios, característicos (Figura 9). Os grânulos ovóides são desigualmente alongados ou triangulares, de 30  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$

de diâmetro. Os grânulos subesféricos medem de 10  $\mu\text{m}$  a 35  $\mu\text{m}$ . O hilo é pontuado excêntrico disposto na parte mais estreita do grão, com estrias bem nítidas e concêntricas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

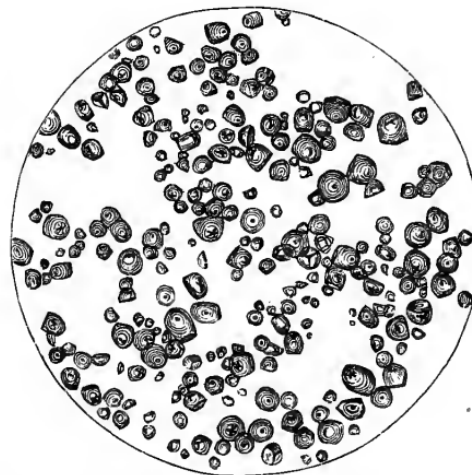
Figura 9: Grânulo de fécula de batata.



*Elaborado por: Clayton e Hassal, 1909.*

Na fécula de mandioca (Figura 10) os grânulos variam de 25  $\mu\text{m}$  a 35  $\mu\text{m}$  de diâmetro, irregularmente arredondados, em forma de dedal, de esfera truncada em uma ou várias faces, com hilo pontuado, linear ou estrelado, central e bem nítido (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 10: Grânulo de fécula de mandioca.

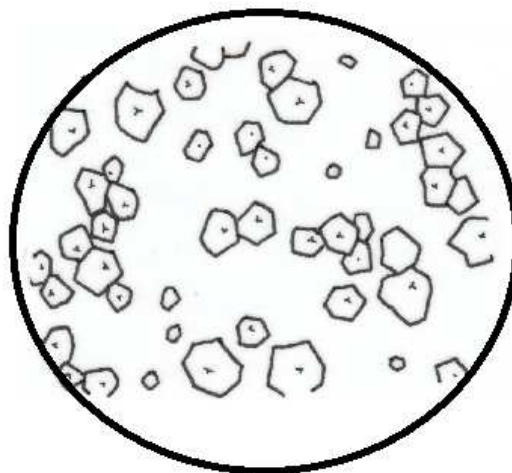


*Elaborado por: Clayton e Hassal, 1909.*

O amido de milho é formado por uma mistura de grânulos de duas formas. Quando provenientes da periferia do albúmen são poliédricos, fortemente

comprimidos, mostrando hilo arredondado, rachado ou estelar e medem, em média, 14  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 11). Quando oriundos da parte mais central do amido mostram contorno pouco anguloso, irregularmente arredondado e são alongados, ovóides ou piriformes e com o hilo maior; e medem, em média, 10  $\mu\text{m}$  a 35  $\mu\text{m}$ . Os grânulos menores agrupam-se, por vezes, assemelhando-se a grânulos compostos, como observado na figura abaixo (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 11: Grânulo de amido de milho.

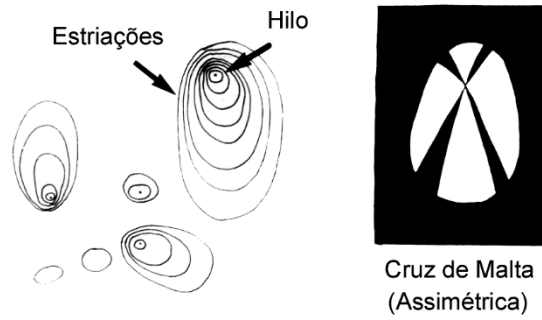


Elaborado por: adaptado Farmacopeia Brasileira, 2010

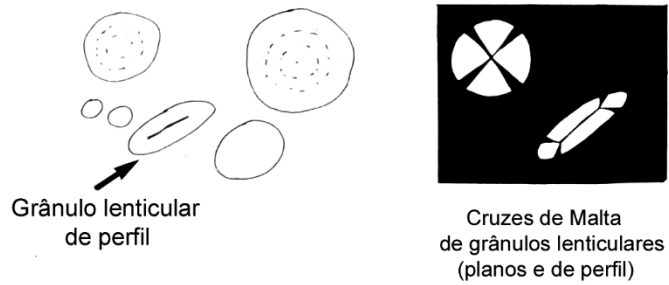
Outros detalhes físicos que ajudam na identificação dos amidos são a aparência do amido quando observado entre polarizadores cruzados, a posição do hilo e a presença de estrias nos grânulos. Estas diferenças são úteis para distinguir, por exemplo, o amido de arroz do amido de trigo que tem grânulos muito similares em forma e tamanho. Todos os amidos intactos são birrefringentes e mostram uma característica a Cruz de Malta quando se observam entre luz polarizadores cruzados. O hilo se situa no centro da cruz, sendo fácil encontrar sua posição em qualquer tipo de preparação (FLINT, 1996), alguns amidos são mostrados na figura 12.

Figura 12: Características morfológicas dos grânulos de amidos e fécula dos alimentos quando são observados com iluminação intensa e entre polarizadores cruzados.

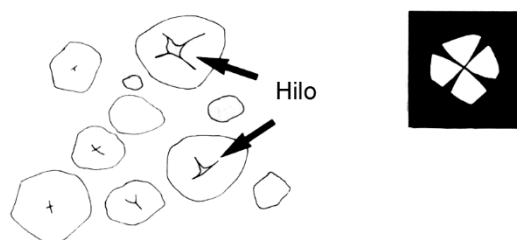
### Fécula de Batata



### Amido de Trigo



### Amido de Milho

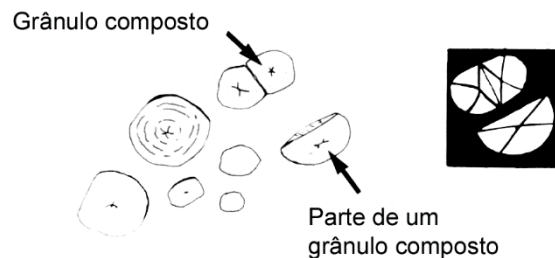




## Amido de Arroz



## Fécula de Tapioca



Elaborado por: Adaptado de Flint ,1996.

No quadro 1 podemos observar as principais características microscópicas dos grânulos de amido e féculas.

Quando o amido cru é danificado mecanicamente, como na moagem de cereais, a birrefringência dos grânulos danificados se altera. Observa-se em um meio de montagem oleoso a perda da intensidade ficando os braços da cruz de Malta mais difusos; em um meio de montagem aquoso os grânulos danificados se incham perdendo-se em um maior grau sua birrefringência residual. Estão faltando no danificados maior birrefringente residual. A maioria dos amidos comerciais contém uma pequena deterioração por que sofreu danos térmicos produzidos durante a secagem do amido através de sua separação por via úmida (FLINT, 1996).

Quadro 1: Principais características microscópicas dos grânulos de amido e de féculas

<b>Amido</b>	<b>Forma Tamanho</b>	<b>Aparência entre polarizadores cruzados</b>	<b>Hilo</b>	<b>Agregados</b>	<b>Estrias</b>
<b>Trigo</b>	Duas formas de tamanho: esférica, 3-7 $\mu\text{m}$ lenticular 15-30 $\mu\text{m}$ tamanho máximo 50 $\mu\text{m}$	Cruz marcada	Central, pequeno	Nenhum	Pouco definidas
<b>Cevada</b>	Lenticular Tamanho máximo 30 $\mu\text{m}$	Cruz marcada	Linear	Nenhum	Pouco definidas
<b>Centeio</b>	Arredodada	Cruz marcada	Radiado (3 – 5 raios)	Nenhum	Pouco definidas
<b>Aveia</b>	Poligonal 10 $\mu\text{m}$	Cruz marcada	Central, pequeno	Numerosos	Indefinidas
<b>Milho</b>	Poliédrica e arredodado 10 -15 $\mu\text{m}$	Cruz bem marcada	Central e estrelado	Nenhum	Indefinidas
<b>Arroz</b>	Poligonal, 5-8 $\mu\text{m}$	Cruz bem marcada	Ponto central	Irregulares pseudo-compostos	Indefinidas
<b>Mandioca</b>	Esféricas irregular, 25- 35 $\mu\text{m}$	Cruz bem marcada	Ponto central	Presentes 2 a 3 grânulos	Indefinidas
<b>Batata</b>	Duas formas de tamanho: arredodadas 10-35 $\mu\text{m}$ ovóide 30-100 $\mu\text{m}$	Cruz bem marcada e intensa	Ponto excêntrico na extremidade menor	Nenhum	Definida

Elaborado por: Adaptado de Farmacopeia Brasileira, 2010 e Beux,1997

### 1.8.3 Propriedades físicas do amido: Gelatinização e Retrogradação.

O amido é praticamente insolúvel em água fria, podendo absorver até 30% do seu peso, com pequeno aumento do volume dos grânulos. Quando aquecido, aumenta enormemente a quantidade de água absorvida. Com isso, o volume dos grânulos aumenta, passando a ocupar todo o espaço possível. Durante esse processo, parte da amilose de menor peso molecular poderá ter passado à solução. Toda a água estará ligada às cadeias de amilose e amilopectina, ou presa nos espaços entre os grânulos, formando uma solução com amilose. A amilose é especialmente sensível à retrogradação, já a amilopectina, por conter uma cadeia mais complexa, apresenta limitada capacidade de reassociação de sua estrutura química (VAN SOEST, 1994). A viscosidade do sistema aumenta até o máximo e a transparência também. Tem-se uma solução viscosa de amido. Se o aquecimento for prolongado à temperatura acima de 100°C, a viscosidade da solução pode diminuir pela destruição de grânulos, ou seja, as estruturas naturais desaparecem e sobram somente moléculas livres hidratadas (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Ao se resfriar, alguns polímeros de amilose e amilopectina solubilizados começam a se reassociar, formando um precipitado ou gel. O gel será mais ou menos duro, conforme a proporção e o tipo de amido, ocorrendo um aumento na opacidade da pasta. Este processo é chamado retrogradação referencias e ocorre aumento da viscosidade. Dependendo do tipo de amido, da fonte botânica, ou se é um amido natural ou modificado, do nível de sólidos, do pH e do regime de aquecimento, vários perfis de gelatinização e empastamento podem ser gerados (THOMAS; ATWELL, 1999).

A retrogradação é basicamente um processo de cristalização das moléculas de amido que ocorre pela forte tendência de formação de pontes de hidrogênio entre moléculas adjacentes. A associação das moléculas do amido propicia o desenvolvimento de uma rede tridimensional mantida coesa pelas áreas cristalinas. Esta rede é formada por grânulos de amido parcialmente inchados e componentes do amido em solução. A formação desta rede durante o resfriamento resulta no aparecimento de gel (HOOVER, 2001). Com o tempo, este gel formado tem a tendência de liberar água. Esta liberação de água é conhecida como sinérese e é comumente encontrada em alguns produtos como molhos em geral (CEREDA et al., 2001). Devido à retrogradação se potencializar em temperaturas de refrigeração, a

sinérese é frequente em produtos refrigerados e congelados. É importante lembrar que amidos de diferentes fontes botânicas retrogradam em diferentes valores de temperatura (CEREDA et al, 2001). Para cada amido, temos um intervalo de temperatura de gelatinização característico, correspondente ao ponto de máxima viscosidade da solução. Este intervalo de temperatura é medido a partir do início do desaparecimento das zonas cristalinas do grânulo até seu fim, visível em microscópio com luz polarizada (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

De acordo com Silva et al. (2006), a análise de resistência a ciclos de congelamento e descongelamento é importante para caracterizar um tipo de amido em termos de sua aplicabilidade em alimentos que devem ser refrigerados e/ou congelados, visto que a liberação de água é geralmente prejudicial à qualidade do produto final. Amidos ricos em amilose mostram inchamento e solubilidade restritos, mesmo após um período prolongado de aquecimento (LEACH; McCOWEN; SCHOCH, 1959).

Amidos reticulados, quando em estado nativo, ou seja, quando estão se gelatinizando, reagem fracamente com iodo, dando apenas um castanho claro ou cor de palha com a cor diluída de iodo. Amido modificado depois de gelatinizado com iodo dá uma cor púrpura avermelhada (FLINT, 1996).

Olga Flint estudou os efeitos que têm os ingredientes adicionados sobre a gelatinização do amido que são de grande importância. Ela cita que sua influência é tal que com pequeno número de ingredientes como farinha, açúcar, gordura empregados na elaboração de produtos de padaria, podem obter-se uma enorme variedade de texturas. Muitas das diferenças de textura entre as massas, pastéis e biscoitos, se deve ao estado dos grânulos de amido que os contêm, observado no figura 13. Os diferentes graus de gelatinização do amido mostrados no figura 13 se deve as variações na disponibilidade de água. O açúcar diminui a disponibilidade de água e também o faz com a gordura, recobrando os grânulos de amido. Isto explica porque o amido nas massas de pastelaria está menos gelatinizado que o pão, ainda que na massa de pastelaria contêm mais água que em uma massa de pão. A presença de amido nativo observa-se nas camadas exteriores dos bolos e biscoitos porque os produtos sem cozimento contêm uma quantidade muito pequena de água, o que permite que as camadas exteriores se desidratem no forno antes de que alcance a temperatura de gelatinização. A proteína é importante na estrutura do pão; o glúten proporciona a estrutura responsável da retenção do dióxido de carbono nas primeiras

fases do cozimento. Posteriormente, o calor, desnatura a proteína e gelifica o amido que é responsável na formação final. Nos biscoitos, a proteína é responsável pela estrutura inicial que se forma, a estrutura final depende em grande parte da presença de grânulos do amido uniformemente inchados. As casquinhas de sorvete têm uma estrutura totalmente diferente. Em lugar da estrutura de proteína que prende os grânulos de amido gelatinizados, possuem uma matriz de amido gelatinizado que perdeu muito de sua medida de granulosidade, prende o ar, salvo, as gotículas de óleo e as partículas de proteína. Este tipo de estrutura é também típica de alguns produtos extrusados quente, as torradas, os cereais para dejejum e os biscoitos salgados para aperitivos (FLINT, 1996).

Figura 13 : Estado do amido de trigo em produtos de padaria.

Produto	<u>Estado dos grânulos de amido</u>			
	Intacto	Inchado	Gelatinizado	Alterado
<b>Pão</b>		←————→		
<b>Torta</b>		←————→		
<b>Bolos</b>				
camadas exteriores	←————→			
interior		←————→		
<b>Biscoitos</b>				
camadas exteriores	←————→			
interior		←————→		
<b>Biscoitos doces finos</b>				
exteriores	←————→			
interior		←————→		
<b>Casquinhas de sorvete</b>				
Com açúcar			←————→	
Com sacarina			←————→	

Elaborado por: Flint, 1996

#### 1.8.4 Aplicação da identificação de amidos

O amido quando extraído de plantas, sem alteração, denomina-se nativo, tendo ampla utilização em diversos setores como indústria têxtil, de papel, farmacêutica, siderúrgica, plástica e alimentícia (CEREDA, 1996). Serve de matéria-prima para a fabricação de xaropes, dextrose, dextrinas e adoçantes com alto teor de frutose (AMBROSI et al, 2000), servindo de goma na fabricação de papéis e tecidos e em lavanderia. O amido é empregado pela indústria alimentícia como ingrediente em alimentos processados, sendo esta uma de suas principais áreas de aplicação.

O amido de mandioca pode ser utilizado em diversos setores econômicos, tais como siderurgia, metalurgia, indústria têxtil, indústria de papel, além das indústrias farmacêuticas e de alimentos. O amido é um dos polímeros naturais, amido de inhame, com maior potencial de aplicação no desenvolvimento de embalagens biodegradáveis, por ser renovável e obtido a partir de diversas fontes a baixo custo (SANTOS, 2009).

A caracterização de amido tem fornecido dados para a utilização de amidos de diferentes fontes vegetais em várias áreas de aplicações, desde a alimentação humana até a utilização do polímero para produção de filmes biodegradáveis (NUNES; SANTOS; CRUZ, 2009).

A produção de amidos modificados é uma alternativa que vem sendo desenvolvida há algum tempo com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos e assim aumentar a utilidade deste polímero nas aplicações industriais (LEONEL, JACKEY, CEREDA, 1998).

Segundo Freitas (2002), grânulos de amido podem ser usados na identificação e análise de materiais arqueológicos vegetais.

Segundo Menezes (1949), a histologia característica para cada substância propicia ao microscopista a identificação do produto e a avaliação do grau de pureza do mesmo.

As características morfológicas dos amidos podem ser utilizadas para sua identificação e/ou constatação de fraudes em alimentos. Produtos são frequentemente adulterados por adição de outras substâncias como adição de farinhas inferiores em farinha de trigo, de farinha de trigo com raspas de mandioca em pães de sêmolas e amido no iogurte para aumentar seu volume e espessamento (EVANGELISTA, 1989).

Os adulterantes mais comumente usados desde a década de 80, auge da adulteração de café no Brasil, são milho, cevada, trigo e centeio, em concentrações que variam entre 20 e 40%. A detecção de fraudes por microscopia ótica é muito utilizada para café em pó desengordurado e tamisado (AMBONI, 1999).

Leonel (2007) descreve que o tamanho e a forma de grânulos de amido estão entre os fatores de importância na determinação de usos potenciais de amidos. Por exemplo, grânulos pequenos (2,0  $\mu\text{m}$ ) podem ser usados como substitutos de gordura devido ao tamanho ser semelhante ao dos lipídeos. Outras aplicações, nas quais o tamanho dos grânulos é importante, é a produção de filmes plásticos biodegradáveis e de papéis para fax.

Uma adulteração que ocorre frequentemente no leite é a fraude por adição de água. Este procedimento causa alterações na crioscopia, densidade, acidez e teor de sólidos. Este tipo de fraude, contudo, geralmente é acompanhado da adição de reconstituintes de densidade como o sal, o açúcar, o amido de milho comercial e a farinha de trigo, utilizados na tentativa de mascarar as alterações promovidas pela água acrescentada (RIOS et al, 2011).

### 1.9 Métodos de Triagem

Os métodos rápidos surgiram a partir da década de 70, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos sensíveis e específicos, se comparados às técnicas convencionais. As avaliações dos mesmos, mostram que o bom desempenho desses métodos está relacionado com o tipo de alimento, isto pode ser atribuído, na maioria das vezes à composição química do alimento, por isso, é aconselhável executar estudos comparativos para assegurar a eficiência da análise. Tais métodos também podem oferecer economia de espaço e materiais, aumentando a produtividade laboratorial, alternando a necessidade de rapidez dos resultados, em face do alto volume de alimentos à disposição do consumidor em curto espaço de tempo (SILVA, 1996; HAJDENWURCEL; SOUZA, 1998; FRAQUEZA, 2002).

Os sistemas de triagem são planejados para minimizar ou eliminar o tratamento da amostra ou uso de equipamentos da amostra ou uso de equipamentos custosos, ou ambos. Como características e vantagens dos métodos rápidos, pode-se enumerar: métodos de resposta e decisão rápidas consequentemente redução do

tempo de análise (ADAB et al., 1999), diminuição do processamento de um grande número de amostras – substâncias tóxicas ou poluentes simplificando as tarefas envolvidas na análise, diminuição das operações preliminares de um processo analítico convencional – erros sistemáticos, diminuição do uso permanente de instrumentos dispendiosos e de alto custo de manutenção, menor tempo de retenção do produto na indústria, facilidade de leitura dos resultados, especificidade e maior sensibilidade de alguns métodos quando comparados com os métodos convencionais, somente amostras positivas serão utilizadas para quantificação nesses instrumentos ( MUÑOZ –OLIVAS, 2004).

Contudo, ao se escolher e implantar os métodos rápidos deve se levar em conta parâmetros como precisão, custo, tempo de análise, aceitabilidade pelos órgãos oficiais, simplicidade de operação, assistência técnica dos fabricantes e disponibilidade de espaço no laboratório. Porém, segundo Feng (1995), os métodos rápidos aprovados pelos órgãos oficiais podem ser utilizados somente para controle, sendo que os resultados negativos são considerados como definitivos, mas resultados positivos são considerados presuntivos e devem ser confirmados por métodos padrões. No caso de métodos qualitativos, a avaliação de parâmetros como seletividade e limite de detecção é fundamental para o conhecimento de seu potencial aplicativo e limitações (SANCHES et al, 2006).

Estima-se que até dez por cento dos ensaios executados a cada ano no mundo inteiro sejam desnecessários, com desperdício de recursos financeiros e de mão de obra qualificada (HIGSON, 2009). Para evitar tal desperdício, métodos mais simples podem ser utilizados para triagem, podendo fornecer informações que permitam direcionar a análise. Os métodos mais rápidos são mais acessíveis e de menor custo quando comparados aos métodos mais sofisticados.

Na análise de alimentos, o exame microscópico é de todos os métodos analíticos o que pode mais rapidamente proporcionar informações de fundamental importância qualitativa levando a uma conclusão real e satisfatória na identificação desejada (FLINT, 1996). Menezes também afirma que exame microscópico, quando aplicável, é uma técnica rápida, de baixo custo e eficiente nas identificações desejadas fornecendo laudo diagnóstico conclusivo em análises bromatológicas (MENEZES, 1949).

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 para a instituição na utilização de técnicas mais acessíveis e de baixo custo na triagem de amostras quando comparada às análises mais sofisticadas.

Como citamos anteriormente, o tratamento para a doença celíaca é basicamente dietético e consiste na exclusão do glúten da dieta do paciente, pelo resto da vida. O glúten representa cerca de 90% do conteúdo protéico dos grânulos de trigo, centeio, cevada e aveia. Embora a porcentagem protéica dentro do grão não seja alta, de 9 a 14% do seu conteúdo seco, quantidades muito pequenas já podem iniciar a resposta imunológica nos pacientes celíacos (SIPAHI, 2010). No Brasil, em relação aos países europeus, as dificuldades são maiores pela falta de informações sobre o conteúdo de glúten em vários alimentos (MORAIS, 1998).

Podemos considerar evidências de risco: a alta prevalência da doença celíaca em nosso meio; 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 metodologias que possam ajudar a melhorar este quadro, como identificação de amidos através da Microscopia, como meio de comprovação da autenticidade de um produto frente à lista de ingredientes contida em seu rótulo, contribuindo para a prevenção e promoção da saúde dos celíacos.

A proposta deste trabalho é desenvolver um método rápido, de baixo custo para identificação por Microscopia de amidos em alimentos, rotulado pelo fabricante como “não contém glúten” ou “contém glúten”, e comparar a Microscopia com os métodos, previamente estudados: imunoenzimático em biscoitos (PIRES, 2013) e farinhas (MORAIS et al, 2013) e PCR em biscoitos (PIRES, 2013).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Propor um método de triagem por microscopia ótica para identificar amidos presentes em alimentos farináceos, biscoitos e farinhas, declarados no rótulo “não contém glúten” ou “contém glúten”.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Caracterizar os amidos presentes em cereais como trigo, centeio, cevada e aveia, em temperaturas diferentes para serem usados como material de referência positivo no estudo.

- Caracterizar os amidos presentes em arroz, milho e fécula de mandioca e batata, para serem usados como material de referência negativo no estudo.

- Identificar por microscopia a presença de amidos estranhos ou não aos produtos previamente estudados pelos métodos: imunoenzimático em biscoitos (PIRES, 2013) e farinhas (MORAIS et al, 2013) e PCR em biscoitos (PIRES, 2013).

- Cotejar e avaliar os resultados obtidos com o método de triagem por microscopia frente aos resultados obtidos por aquelas autoras.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 AMOSTRAS

Foram adquiridas 40 amostras no comércio varejista no município do Rio de Janeiro. Destas, 30 são amostras de biscoitos, dos quais, 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 foram previamente descritas e analisadas por ELISA e PCR na dissertação de Pires (2013) e estão apresentadas no quadro 2 e 3.

Foram escolhidas as amostras de biscoito (PIRES, 2013) devido ao fácil acesso e por serem consumidas por crianças e adolescentes geralmente utilizados em encontros, festas, reuniões organizadas por estes, levando em consideração o risco à saúde quando consumidos especialmente por celíacos.

Segundo Pires (2013), 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.

Os quadros 2, 3, 4 e 5 apresentam os dois tipos de amostras analisadas no estudo: produtos industrializados declarados no rótulo “não contém glúten” e “contém glúten”.

Para o 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, as sementes de cevada e aveia foram adquiridas através da Cooperativa Agrária (Guarapuava- PR) (PIRES,2013).

Todos os alimentos foram manipulados e distribuídos em alíquotas sob critérios rígidos de assepsia. As amostras foram trituradas em triturador elétrico e armazenadas a (-20°C +/- 1) em tubos estéreis vedados. 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 (PIRES, 2013). As metodologias utilizadas para identificação de amido em biscoitos, farinhas e para a produção de fotomicrografias foram adaptadas das descritas por Rodrigues et al. (1999).

Quadro 2: Descrição das amostras de alimentos farináceos, biscoitos, declarados no rótulo “não contém glúten” (PIRES, 2013).

<b>Código das amostras</b>	<b>Descrição das amostras</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>ELISA Conc calc. de gluten(mg/kg)</b>	<b>PCR</b>
1	Biscoito de Povilho Salgado	Mandioca	Não Contém Glúten 9,00	Trigo Cevada
2	Snack de Soja Legumes ao Queijo	Farinha de Arroz Farinha de Soja Integral	Contém Glúten 34,00	Trigo, Cevada
3	Snack de Soja Ervas Finas	Farinha de Arroz Farinha de Soja Integral	Não Contém Glúten 11,00	Trigo, Cevada
4	Cookies Maça, Canela e Passas	Farinha de Arroz Integral Farinha de Soja Integral Amido de Milho	Não Contém Glúten 8,00	Trigo, Cevada Aveia
5	Snack de Soja Calabresa com Pimenta	Farinha de Arroz Farinha de Soja Integral	Não Contém Glúten 7,00	Trigo, Cevada
6	Snack de Soja de Queijo	Farinha de Arroz Farinha de Soja Integral	Não Contém Glúten 7,00	Trigo, Centeio Cevada
7	Snack de soja Pizza	Farinha de Arroz	Contém Glúten 30,00	Trigo, Cevada
8	Snack de Soja Requeijão	Farinha de Arroz	Não Contém Glúten 6,20	Trigo, Centeio
9	Granytos com Tortilha Chips	Tortilhas de Milho	Não Contém Glúten 6,30	Trigo, Cevada
10	Snack Integral Assado Crocante com Tomate e Orégano	Milho Integral Fibra de Milho	Não Contém Glúten 16,00	Trigo, Aveia
11	Snacks Integrais Ervas Finas	Canjica de Milho Integral	Não Contém Glúten 11,00	Trigo, Cevada
12	Biscoito Amanteigados Banana com Canela	Amido de Milho Farinha de Arroz	Não Contém Glúten 7,3	Trigo, Cevada
13	Bolacha	Farinha de Arroz Fécula de Batata Fécula de Mandioca Amido de Miho	Não Contém Glúten 13,00	Trigo, Cevada
14	Snack de Soja com Bacon	Farinha de Arroz	Não Contém Glúten 19,00	Trigo, Cevada, Aveia
15	Snacks Integrais Assado Crocante de Queijo	Canjica de Milho Fibra de Milho, Mandioca	Não Contém Glúten 11,00	Trigo, Cevada

Quadro 3: Descrição das amostras de alimentos farináceos, biscoitos, declarados no rótulo “ contém glúten” (PIRES, 2013).

<b>Código da amostras</b>	<b>Descrição</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>ELISA Conc. calc. de glúten (mg/kg)</b>	<b>PCR</b>
<b>16</b>	Biscoito Integral	Farinha de Trigo Integral	Contém Glúten 131,0	Trigo, Cevada
<b>17</b>	Biscoito Salgado Integral	Farinha de Trigo Integral	Não Contém Glúten 16,0	Trigo, Centeio Cevada
<b>18</b>	Biscoito Salgado	Farinha de Trigo, Farinha de Trigo Integral,	Contém Glúten 160,0	Trigo, Centeio Cevada Aveia
<b>19</b>	Cookie Integral Aveia e Mel	Farinha de Trigo Integral e Farinha Trigo, Aveia em Flocos, Fécula de Mandioca	Contém Glúten 172,0	Trigo Centeio Cevada Aveia
<b>20</b>	Biscoito de Leite Maltado Light	Farinha de Trigo, Amido de Milho	Contém Glúten 113,0	Trigo Cevada Aveia
<b>21</b>	Biscoito Maisena	Farinha de Trigo, Amido de Milho	Contém Glúten 175,0	Trigo Centeio Cevada
<b>22</b>	Biscoito Salgado	Farinha de Trigo	Contém Glúten 152,0	Trigo Centeio Cevada
<b>23</b>	Biscoito Salgado Integral	Farinha de Trigo Integral	Contém Glúten 152,0	Trigo Centeio Cevada Aveia
<b>24</b>	Biscoito de Presunto	Farinha de Trigo	Contém Glúten 147,0	Trigo Centeio Cevada
<b>25</b>	Biscoito Salgado Integral	Farinha De Trigo, Farinha De Trigo Integral	Contém Glúten 138,0	Trigo Centeio Cevada Aveia
<b>26</b>	Biscoito Integral de Trigo e Flocos de Arroz	Farinha de Trigo, Farinha Trigo Integral, flocos de Arroz, Farinha de Centeio Integral	Contém Glúten 123,0	Trigo Centeio Cevada
<b>27</b>	Biscoito Salgado	Farinha De Trigo	Contém Glúten 119,0	Trigo Centeio Cevada Aveia
<b>28</b>	Pit Stop Integral	Farinha de Trigo, Farelo de Trigo	Contém Glúten 100,0	Trigo Centeio Cevada
<b>29</b>	Cookie Integral Light de Mel e Linhaça	Farinha de Trigo, Amido de Milho, Aveia	Contém Glúten 139,0	Trigo Centeio Cevada Aveia
<b>30</b>	Biscoito de Leite Com Grânulos de Aveia	Farinha de Trigo, Farinha de Trigo Integral, Aveia em Flocos, Farinha de Centeio, Farinha de Cevada	Contém Glúten 152,0	Trigo Centeio Cevada

As outras 10 amostras de farinha, descritas no quadro 4 e 5, foram adquiridas de estabelecimentos comerciais também no município do Rio de Janeiro seguindo como critério de escolha o uso rotineiro na dieta e produtos de interesse para os celíacos pelo Núcleo de Alimentos, Microscopia e Métodos Rápidos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e analisadas pelo método de ELISA na detecção de glúten para avaliar a veracidade dos rótulos dos alimentos processados (MORAIS et al, 2013).

Quadro 4: Descrição das amostras de alimentos farináceos, farinhas, declarados pelo fabricante “não contém glúten” (MORAIS et al, 2013).

<i>Código das amostras</i>	<i>Descrição</i>	<i>ELISA Conc calc. de gluten (mg/kg)</i>
<b>2*</b>	Fécula de mandioca	Não contém Glúten 7,85
<b>3*</b>	Amido de arroz	Não contém Glúten 11,50
<b>4*</b>	Fécula de Batata	Contém Glúten 35,73
<b>5*</b>	Farinha de mandioca, proteína texturizada de soja, óleo vegetal, alho, sal, cebola e condimentos diversos	Não contém Glúten 5,71
<b>6*</b>	Farinha de milho	Não contém Glúten 6,37

Quadro 5: Descrição das amostras de alimentos farináceos, farinhas, declarados pelo fabricante “contém glúten” (MORAIS et al, 2013).

<i>Código das amostras</i>	<i>Descrição</i>	<i>ELISA Conc calc. de gluten (mg/kg)</i>
<b>7*</b>	Farinha de milho	Não contém Glúten 8,86
<b>8</b>	Fécula de mandioca, farinha de trigo, proteína vegetal, gordura vegetal, cebola, sal e especiarias	Contém Glúten 262,70
<b>9*</b>	Farinha de milho	Não contém Glúten 6,59
<b>10*</b>	Farinha de milho, óleo vegetal, alho, sal, cebola e pimentas diversas	Não contém Glúten 7,62
<b>11*</b>	Farinha de milho	Não contém Glúten 6,07

### 3.2 PRODUÇÃO DE FOTOMICROGRAFIAS DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA.

Foram comprados grânulos dos cereais trigo, centeio, cevada, aveia, arroz, milho e tubérculos como mandioca, batata em estabelecimento varejista no município do Rio de Janeiro. Para cada cereal e tubérculo triturado foi tomada uma alíquota de 3 g e foram adicionados 20 mL de água destilada e submetido a agitação com bastão de vidro. Foi retirada uma gota do material para a preparação da lâmina utilizando uma gota de lugol (Iodo p.a. 1g, Iodeto de potássio p.a. 2 g, água destilada q.s.p. 200 mL) como corante, sendo posteriormente examinado ao microscópio com e sem luz polarizada em aumentos de 100, 200 e 400 X para identificação dos grânulos de amido, comparando-os com referências bibliográficas quando existentes. Cada tipo de cereal foi submetido a três diferentes temperaturas, simulando o tratamento recebido pelas amostras: 2 a 8 ° C por 24h para armazenamento, temperatura ambiente ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ); e aquecimento levando à ebulição ( $>100^{\circ}\text{C}$ ) até alteração da consistência para goma. Com o objetivo de auxiliar na comparação dos grânulos do amido ao sofrer alteração em suas características morfológicas quando submetido a diferentes temperaturas foram feitas as fotomicrografias. A microscopia foi realizada utilizando um microscópio Carl Zeiss (Alemanha), modelo Axioscopy. O procedimento para o preparo de amostra para a microscopia com luz polarizada é o mesmo para a microscopia óptica.

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO DO AMIDO POR MICROSCOPIA NAS AMOSTRAS DE BISCOITOS

Foi retirada uma alíquota de 3 g do biscoito triturado, transferida para um bécher de 100 mL e adicionados 60 ml da mistura álcool (etílico ou isopropílico): éter, na proporção 1:1 (v/v). A mistura foi agitada com bastão de vidro, deixando em contato por quinze minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada a vácuo utilizando o papel de filtro para filtragem rápida em funil de Büchner. A mistura éter-álcool 1:1 (v/v) foi adicionada até a retirada da maior parte da gordura da amostra. Após a filtração, o papel de filtro foi transferido para placa de Petri. O material foi secado à temperatura ambiente. Todo este procedimento foi realizado na capela de exaustão.

A seguir, em um bécher, foram adicionados 20 mL de água destilada ao material seco e submetido à agitação com bastão de vidro para extração do amido.

Foi retirada uma gota do material para a preparação da lâmina utilizando uma gota de lugol como corante sendo posteriormente examinado ao microscópio com e sem luz polarizada em aumentos 100, 200 e 400 X para identificação dos grânulos de amido, comparando-os com padrões de referência, desenhos ou fotomicrografias. A microscopia foi realizada utilizando um microscópio Carl Zeiss (Alemanha), modelo Axioscopy. O procedimento para o preparo de amostra para a microscopia com luz polarizada é o mesmo para a microscopia óptica.

### 3.4 IDENTIFICAÇÃO DO AMIDO POR MICROSCOPIA NAS AMOSTRAS DE FARINHAS

Pesou-se 3 g de amostra e foram adicionados 20 mL de água destilada e submeteu-se à agitação com bastão de vidro. Foi retirada uma gota do material para a preparação da lâmina utilizando uma gota de lugol como corante sendo posteriormente examinado ao microscópio com e sem luz polarizada em aumentos 100, 200 e 400 X para identificação dos grânulos de amido, comparando-os com padrões de referências, desenhos ou fotomicrografias. A microscopia foi realizada utilizando um microscópio Carl Zeiss (Alemanha), modelo Axioscopy. O procedimento para o preparo de amostra para a microscopia com luz polarizada é o mesmo para a microscopia óptica.

### 3.5 LIMITE DE DETECÇÃO E SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA BISCOITOS

Foi retirada uma alíquota de 3 g do biscoito triturado, transferida para um bécher de 100 mL e adicionados 60 mL da mistura álcool (etílico ou isopropílico): éter, na proporção 1:1 (v/v). A suspensão foi filtrada e seca e foi tomado 0,025 g e adicionado a 99,975 g de farinha de milho como matriz e avolumando com água até 1.000 mL em cilindro graduado obtendo a concentração final de 25 mg/kg (ppm) de amostra.

Esta solução foi diluída para se obter as concentrações de 2,5; 3,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0 mg/kg (ppm) para a identificação de amido contidos na amostra, como batata, trigo, mandioca, milho, centeio e cevada. A amostra de biscoito escolhida por conter baixo teor de gliadina, abaixo de 20mg/kg. A matriz farinha de milho foi escolhida por não conter glúten, foi identificado apenas amido de milho em uma análise prévia ao estudo pelo método de Microscopia, para verificar o limite de



detecção. Foi realizada a leitura em aumento de 200X e 400X em microscópio óptico com e sem luz polarizada. A microscopia com e sem luz polarizada foi realizada utilizando um microscópio Carl Zeiss (Alemanha), modelo Axioscopy e para pesagem balança semi-micro analítica, modelo AG285, Mettler Toledo. O procedimento para o preparo de amostra para a microscopia com luz polarizada é o mesmo para a microscopia óptica. Para demonstrar a seletividade: Um mínimo de 80% das amostras deve apresentar amido identificável (adaptado de EMA, 2011).

### 3.6 LIMITE DE DETECÇÃO E SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA FARINHAS

Foi retirada uma alíquota de 0,025 g de fécula de batata e adicionado a 99,975 g de farinha de milho como matriz e avolumando com água até 1.000 mL em cilindro graduado obtendo a concentração final de 25 mg/kg (ppm) de amostra. Esta solução foi diluída para se obter as concentrações de (2,5; 3,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0) mg/kg (ppm) para a identificação de amido de batata, trigo, mandioca e milho contidos na fécula de batata. A amostra de fécula de batata possui alto teor de gliadina, acima de 20 mg/kg. A matriz farinha de milho foi escolhida por não conter glúten, foi identificado apenas amido de milho em uma análise prévia ao estudo, para verificar o limite de detecção. Foi realizada a leitura em aumento de 200X e 400X em microscópio óptico com e sem luz polarizada. A microscopia com e sem luz polarizada foi realizada utilizando um microscópio Carl Zeiss (Alemanha), modelo Axioscopy. e para pesagem balança semi-micro analítica, modelo AG285, Mettler Toledo. O procedimento para o preparo de amostra para a microscopia com luz polarizada é o mesmo para a microscopia óptica. Para demonstrar a seletividade um mínimo de 80% das amostras deve apresentar amido identificável (adaptado de EMEA, 2011).

### 3.7 - CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NOS MÉTODOS ELISA, PCR E MICROSCOPIA.

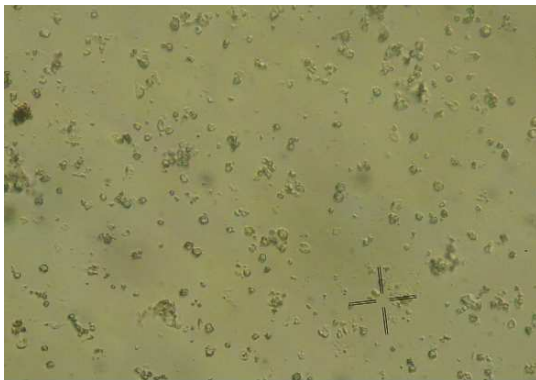
Os resultados categóricos (positivo ou negativo) para a presença dos cereais trigo, cevada, centeio e aveia foram obtidos nas diferentes técnicas e a porcentagem de concordância entre os métodos, foi calculada e classificada como: Pobre (<0.00%), Leve (0-20) %, Razoável (21–40)%, Moderada (41–60)%, Substancial (61–80)% ou Quase Perfeita (81–100)%, como descrito por Landis e Koch (1977).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PRODUÇÃO DE FOTOMICROGRAFIAS COMO MATERIAL DE REFERÊNCIA.

Na imagem 1 estão apresentadas fotomicrografias das 3 lâminas que servem para caracterizar os grânulos de amidos presentes em arroz.

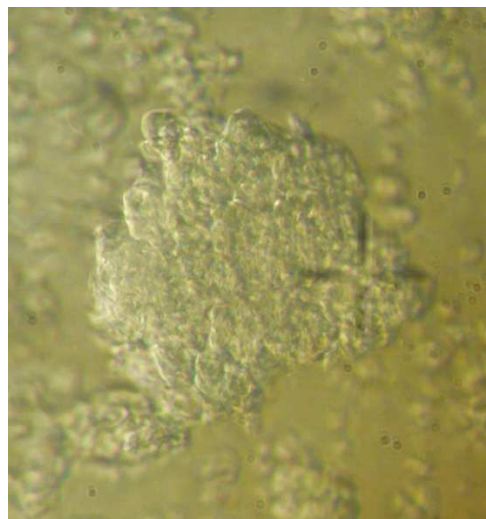
Imagem 1 a) arroz temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) ° C (aumento 200X); b) arroz temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ ) ° C com luz polarizada (aumento 200X); c) arroz aquecimento levando à ebulição ( $>100$  ° C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada (aumento 400X).



(a)



(b)

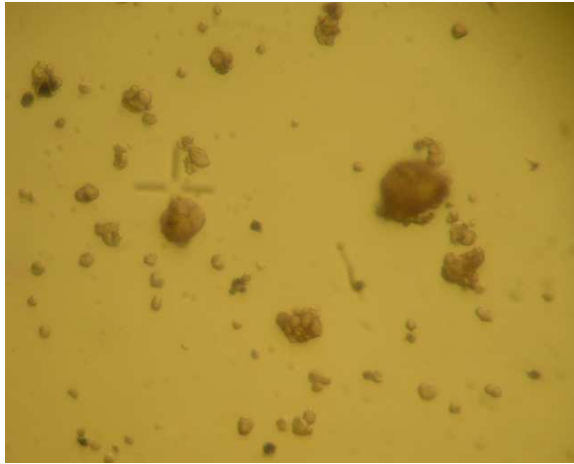


(c)

Elaborado por: autora

Na imagem 2 estão apresentadas fotomicrografias das 2 lâminas que servem para caracterizar os grânulos de amidos presentes em aveia.

Imagem 2 a) aveia temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C (aumento 200X); b) aveia temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C com luz polarizada (aumento 200X); c) aveia aquecimento levando à ebulição ( $>100$  ° C) até alteração da consistência para goma (aumento 400x).



(a)



(b)

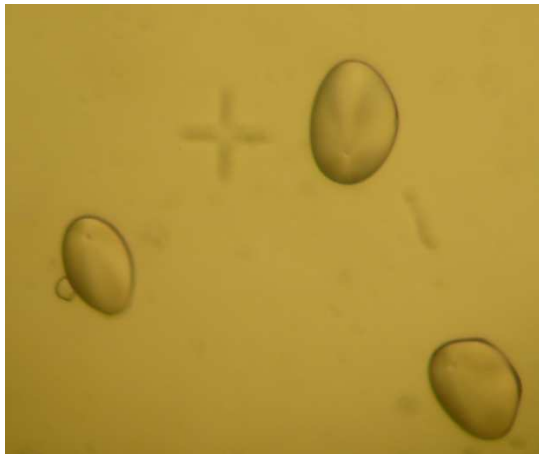


(c)

Elaborado por: autora

Na imagem 3 estão apresentadas fotomicrografias das 2 lâminas que servem para caracterizar os grânulos de amidos presentes em batata.

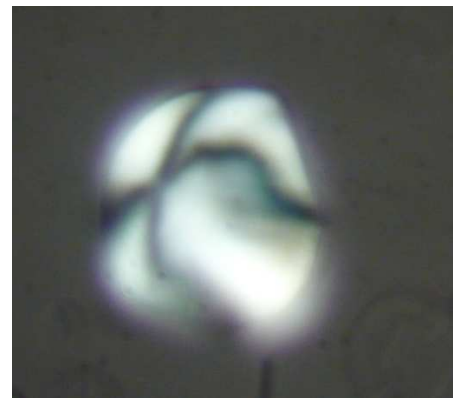
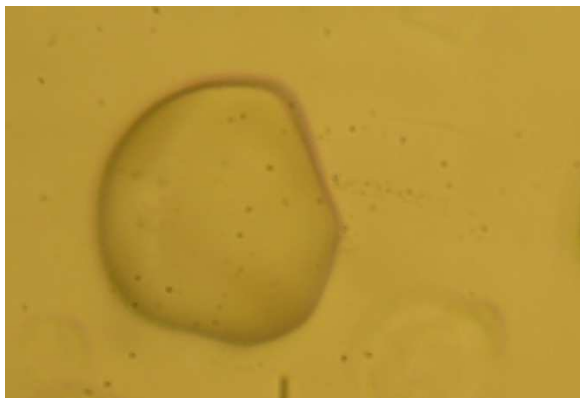
Imagem 3 a) Batata temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C (aumento 200X); b) batata temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C (aumento 200X); c) batata aquecimento levando à ebulição ( $>100$  ° C) até alteração da consistência para goma sem e com luz polarizada (aumento 400X).



(a)



(b)



(c)

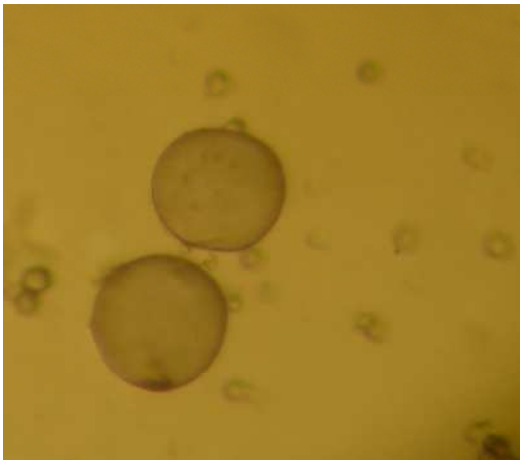
Elaborado por: autora

Na imagem 4 estão apresentadas fotomicrografias das 2 lâminas que servem para caracterizar os grânulos amidos presentes em centeio.

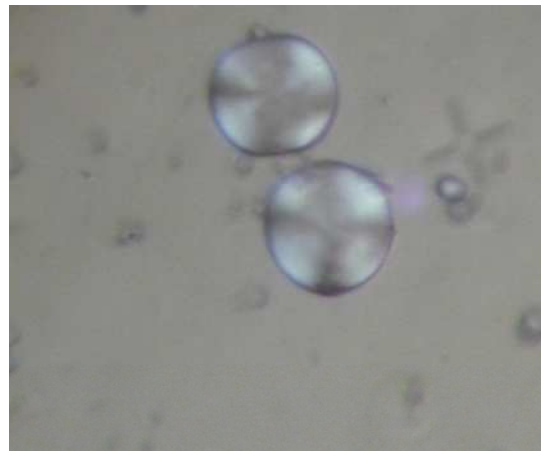
Imagem 4 a) centeio temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C (aumento 200X); b) centeio aquecimento levando à ebulição ( $>100$  ° C) até alteração da consistência para goma (aumento 200X); c) centeio aquecimento levando à ebulição ( $>100$  ° C) até alteração da consistência para goma.com luz polarizada ° C (aumento 200X).



(a)



(b)

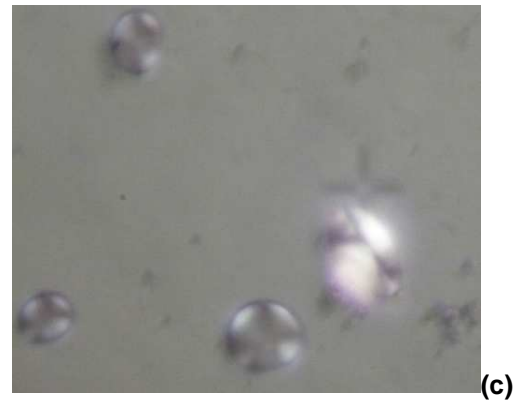
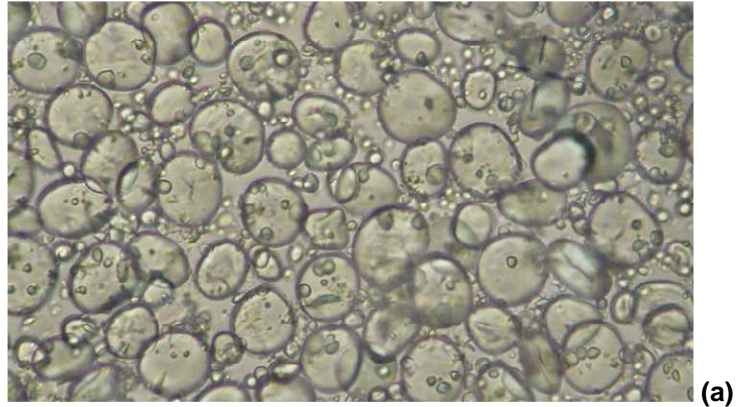


(c)

Elaborado por: autora

Na imagem 5 estão apresentadas fotomicrografias das 2 lâminas que servem para caracterizar os grânulos de amidos presentes em cevada.

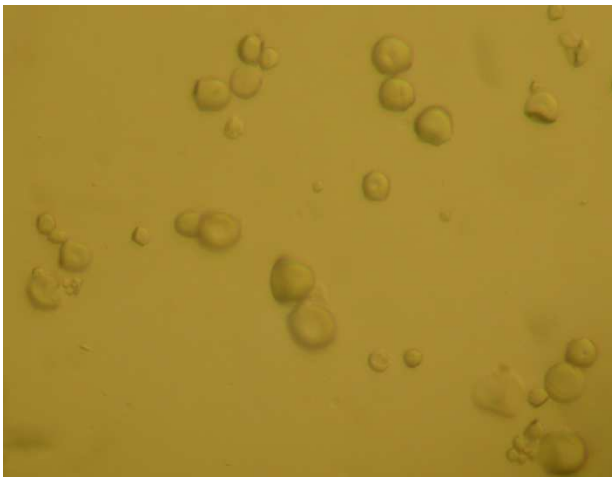
Imagem 5 a) cevada temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C (aumento 200X); b) cevada aquecimento levando à ebulição ( $>100$  ° C) até alteração da consistência para goma (aumento 200X) ; c) cevada aquecimento levando à ebulição ( $>100$  ° C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada (aumento 200X) .



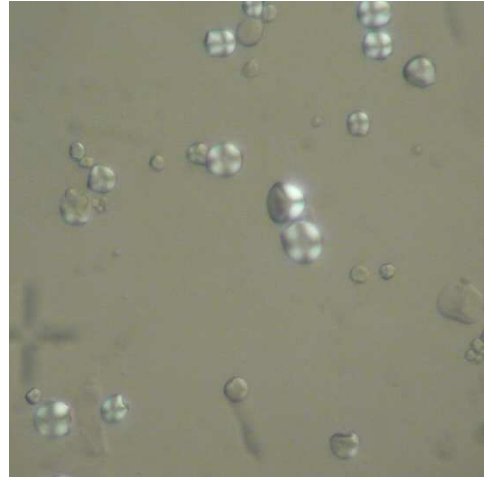
Elaborado por: autora

Na imagem 6 estão apresentadas fotomicrografias das 2 lâminas que servem para caracterizar os grânulos de amidos presentes em mandioca.

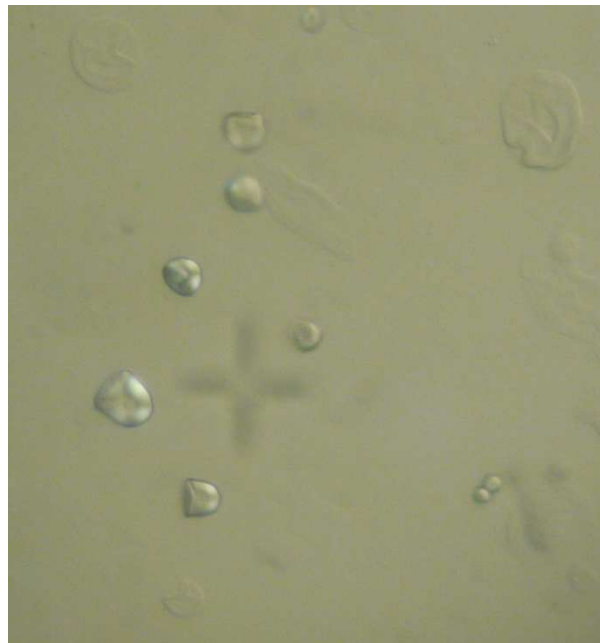
Imagem 6 a) Mandioca temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C (aumento 200X); b) mandioca temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C com luz polarizada (aumento 200X); c) mandioca aquecimento levando à ebulição ( $>100$  ° C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada (aumento 200X).



(a)



(b)

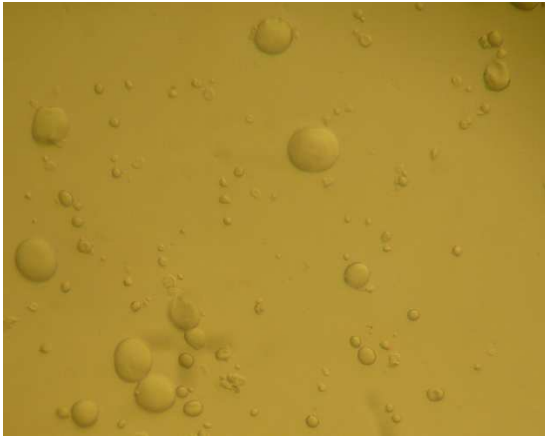


(c)

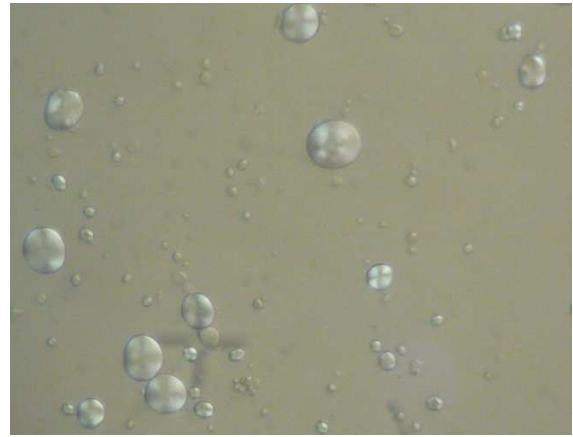
Elaborado por: autora

Na imagem 7 estão apresentadas fotomicrografias das 2 lâminas que servem para caracterizar os grânulos amidos presentes em trigo.

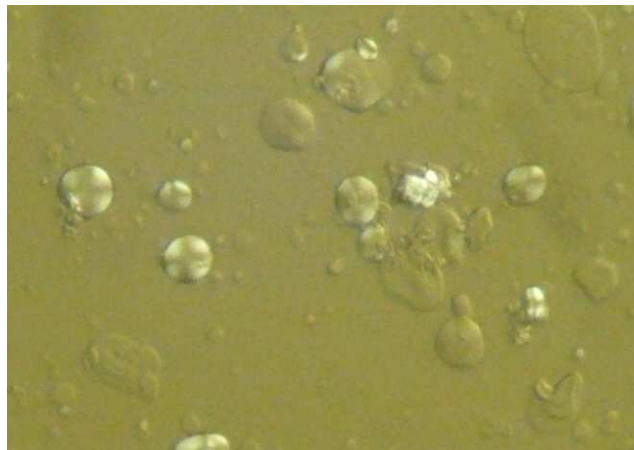
Imagem 7 a) trigo temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C (aumento 200X); b) trigo temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C com luz polarizada (aumento 200X); c) trigo aquecimento levando à ebulição ( $>100$  ° C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada (aumento 200X).



(a)



(b)



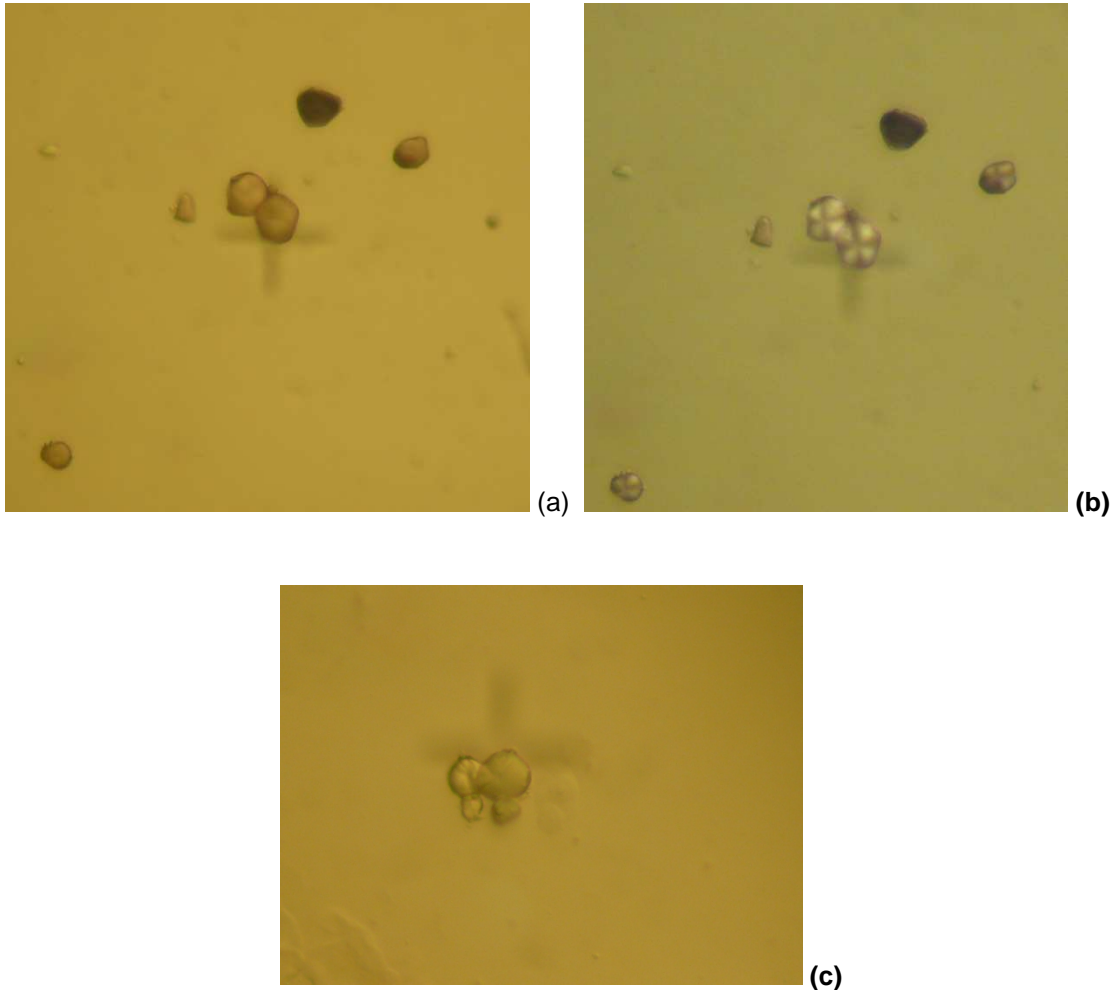
(c)

Elaborado por: autora



Na imagem 8 estão apresentadas fotomicrografias das 2 lâminas que servem para caracterizar os grânulos amidos presentes em milho.

Imagem 8 a) Milho temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C (aumento 200 X); b) milho temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C com luz polarizada (aumento 200 X); c) milho aquecimento levando à ebulição ( $>100$  ° C) até alteração da consistência para goma com luz polarizada (aumento 200 X).



Elaborado por: autora

#### 4.2 IDENTIFICAÇÃO DO AMIDO POR MICROSCOPIA

Os resultados quanto à presença dos amidos identificados pela microscopia em alimentos farináceos, com declaração do rótulo “não contém glúten” ou “contém glúten” estão dispostos no quadro 6, 7, 8 e 9.

As imagens obtidas nos resultados pelo método por microscopia citadas nos quadros, se encontram no Apêndice A nas páginas 98 a 111.

Quadro 6 Resultados do método de triagem por microscopia dos alimentos farináceos, biscoitos, declarados pelo fabricante “não contém glúten”.

<b>Código das amostras</b>	<b>Alimento</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Microscopia</b>
1	Biscoito de povilho salgado	Mandioca	Trigo Mandioca
2	Snack de soja legumes ao queijo	Farinha de arroz, farinha de soja integral	Trigo Cevada Centeio Milho Arroz
3	Snack de soja ervas finas	Farinha de arroz, farinha de soja integral	Trigo Milho Mandioca Arroz
4	Cookies maçã, canela e passas	Farinha de arroz integral, farinha de soja integral, amido de milho	Trigo Cevada Centeio Aveia Mandioca Milho Arroz
5	Snack de soja calabresa com pimenta	Farinha de arroz, farinha de soja integral	Trigo Centeio Mandioca Milho
6	Snack de soja de queijo	Farinha de arroz, farinha de soja integral	Trigo Mandioca Milho
7	Snack de soja pizza	Farinha de arroz	Trigo Centeio Mandioca Milho
8	Snack de soja requeijão	Farinha de arroz	Trigo Milho Mandioca
9	Granytos com tortilha chips	Tortilhas de milho	Trigo Milho Mandioca
10	Snack integrais assado crocante com tomate e orégano	Milho integral, fibra de milho	Trigo
11	Snacks integrais ervas finas	Canjica de milho integral	Cevada Trigo
12	Biscoito amanteigados banana com canela	Amido de milho, farinha de arroz	Trigo Centeio Mandioca Milho
13	Bolacha	Farinha de arroz, fécula de batata, fécula de mandioca, amido de miho	Trigo Centeio Cevada Milho Mandioca
14	Snack de soja com bacon	Farinha de arroz	Trigo Cevada Mandioca Milho Arroz
15	Snacks integrais assado crocante de queijo	Canjica de milho, fibra de milho	Trigo

Quadro 7 Resultados do método de triagem por microscopia dos alimentos farináceos, biscoitos, declarados pelo fabricante “contém glúten”.

<b>Código das amostras</b>	<b>Alimento</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Microscopia</b>
16	Biscoito integral	Farinha de trigo integral	Trigo Cevada Mandioca Centeio
17	Biscoito salgado integral	Farinha de trigo integral	Trigo Centeio Cevada, Aveia, Mandioca, Milho
18	Biscoito salgado	Farinha de trigo, farinha de trigo integral,	Trigo, Centeio, Cevada, Mandioca, Milho
19	Cookie integral aveia e mel	Farinha de trigo integral e Farinha trigo, aveia em flocos, fécula de mandioca	Trigo, Centeio, Mandioca, aveia
20	Biscoito de Leite maltado light	Farinha de trigo, amido de milho	Trigo, Centeio, Cevada, Mandioca, Milho
21	Biscoito maisena	Farinha de trigo, amido de milho	Trigo, Milho, Mandioca, Cevada, Centeio
22	Biscoito salgado	Farinha de trigo	Trigo, Centeio, Cevada, Mandioca, Milho
23	Biscoito salgado integral	Farinha de trigo integral	Trigo, Centeio, Cevada
24	Biscoito de presunto	Farinha de trigo	Trigo, Centeio, Cevada, Mandioca, Arroz
25	Biscoito salgado integral	Farinha de trigo, farinha de trigo integral	Trigo, Centeio, Cevada, Mandioca
26	Biscoito integral de trigo e flocos de arroz	Farinha de trigo, farinha trigo integral, flocos de arroz, farinha de Centeio integral	Trigo, Centeio, Cevada, Mandioca, Arroz
27	Biscoito salgado	Farinha de trigo	Trigo, Centeio, Cevada, aveia, Mandioca
28	Pit Stop integral	Farinha de trigo, farelo de trigo	Trigo, Centeio, Cevada, Mandioca
29	Cookie integral light de mel e linhaça	Farinha de trigo, amido de milho, aveia	Trigo, Centeio, Cevada, aveia, Mandioca
30	Biscoito de leite com grânulos de aveia	Farinha de trigo, Farinha de trigo integral, aveia em flocos, Farinha de centeio, Farinha de cevada	Trigo, Centeio, Cevada, aveia

Quadro 8 Resultados do método de triagem por microscopia dos alimentos farináceos, farinhas, declarados pelo fabricante “não contém glúten”.

<b>Código das amostras</b>	<b>Alimento</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Microscopia</b>
2*	Polvilho Doce	Fécula de mandioca	Trigo, Centeio, Mandioca
3*	Creme de Arroz	Amido de arroz	Mandioca, Milho
4*	Fécula de Batata	Batata	Trigo, Aveia, Centeio, Mandioca, Batata
5*	Farofa de Soja	Farinha de mandioca, proteína texturizada de soja, óleo vegetal, alho, sal, cebola e condimentos diversos	Trigo, Mandioca, Milho
6*	Fubá de Milho de germinado		Trigo, Milho

Quadro 9 Resultados do método de triagem por microscopia dos alimentos farináceos, farinhas, declarados pelo fabricante “contém glúten”.

<b>Código das amostras</b>	<b>Alimento</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Microscopia</b>
7*	Farinha de Milho Fina	Farinha de milho	Milho
8*	Sopa de Cebola	Fécula de mandioca, Farinha de trigo, proteína vegetal, gordura vegetal, cebola, sal e especiarias	Trigo, Centeio, Mandioca, Milho
9*	Fubá	Farinha de milho	Trigo, Mandioca, Milho, Batata
10*	Farinha de Milho temperada	Farinha de milho, óleo vegetal, alho, sal, cebola e pimentas diversas	Trigo, Centeio, Cevada, Milho
11*	Farinha de Milho Flocada	Farinha de milho	Trigo, Milho

#### 4.3 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 farináceos declarados pelo fabricante “não contém glúten” estão dispostos nos quadros 10 e 11.

Quadro 10 Comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático e molecular, da análise de alimentos farináceos, biscoitos, declarados pelo fabricante “não contém glúten”.

<b>Código da amostras</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Microscopia</b>	<b>ELISA Conc. calc. de glúten (mg/kg)</b>	<b>PCR</b>
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

Quadro 11 Comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático e molecular na análise de alimentos farináceos, biscoitos, declarados pelo fabricante “contém glúten” .

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

Os resultados da comparação do método de triagem por microscopia com o método imunoenzimático, da análise de alimentos farináceos declarados pelo fabricante “não contém glúten” e contém glúten estão dispostos no quadro 12 e 13.

Quadro 12 Comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com os métodos imunoenzimático, na análise de alimentos farináceos, farinhas, declarados pelo fabricante “não contém glúten”.

<i>Código da amostras</i>	<i>Ingredientes</i>	<i>Microscopia</i>	<i>ELISA Conc calc. de gluten(mg/kg)</i>
<b>2*</b>	Fécula de mandioca	Trigo, Centeio, Mandioca	Não contém Glúten 7,85
<b>3*</b>	Amido de arroz	Trigo, Mandioca, Milho, arroz	Não contém Glúten 11,50
<b>4*</b>	Fécula de Batata	Trigo, Aveia, Centeio, Mandioca, Batata	Contém Glúten 35,73
<b>5*</b>	Farinha de mandioca, proteína texturizada de soja, óleo vegetal, alho, sal, cebola e condimentos diversos	Trigo, Mandioca, Milho	Não contém Glúten 5,71
<b>6*</b>	Farinha de milho	Trigo, Milho, mandioca	Não contém Glúten 6,37

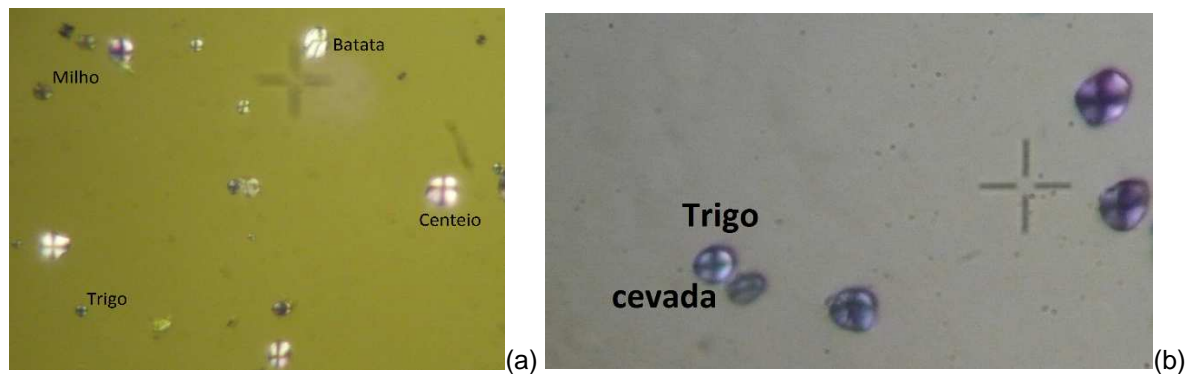
Quadro 13 Comparação dos resultados do método de triagem por microscopia com o método imunoenzimático, na análise de alimentos farináceos declarados pelo fabricante “ contém glúten” .

<i>Código da amostras</i>	<i>Ingredientes</i>	<i>Microscopia</i>	<i>ELISA Conc calc. de gluten(mg/kg)</i>
<b>7*</b>	Farinha de milho	Trigo, Milho	Não contém Glúten 8,86
<b>8*</b>	Fécula de mandioca, Farinha de trigo, proteína vegetal, gordura vegetal, cebola, sal e especiarias	Trigo, Centeio, Mandioca, Milho	Contém Glúten 26,27
<b>9*</b>	Farinha de milho	Trigo, Mandioca, Milho, Batata	Não contém Glúten 6,59
<b>10*</b>	Farinha de milho, óleo vegetal, alho, sal, cebola e pimentas diversas	Trigo, Centeio, Cevada, Milho	Não contém Glúten 7,62
<b>11*</b>	Farinha de milho	Trigo, Milho	Não contém Glúten 6,07

#### 4.4 LIMITE DE DETECÇÃO E SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA BISCOITOS

O intervalo de concentrações estudado foi 2,5 a 25 mg/kg (ppm). O método foi capaz de detectar o amido de batata, trigo, mandioca, milho, centeio e cevada contidos na amostra, biscoito, mostrada na imagem 9. O limite inferior de detecção foi 10 mg/kg (ppm).

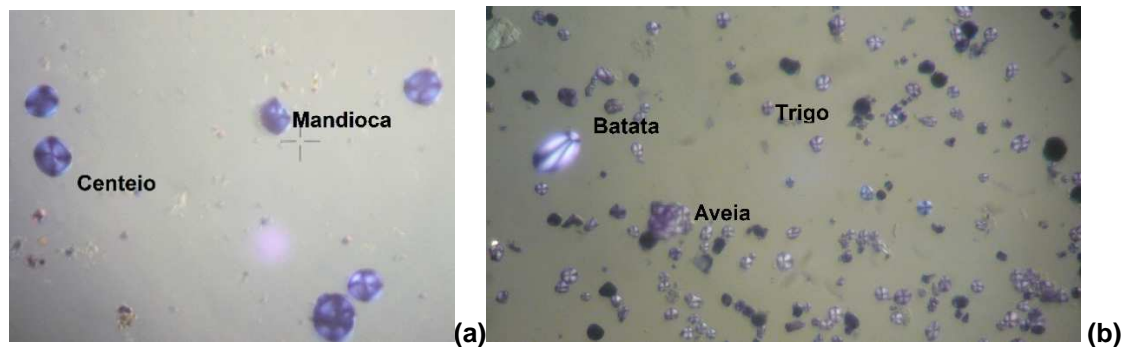
Imagem 9 Amido e fécula presentes no biscoito no limite de detecção 10 mg/kg (aumento 200X).



#### 4.5 LIMITE DE DETECÇÃO E SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA FARINHAS

O intervalo de concentrações estudado foi 2,5 a 25 mg/kg (ppm). O método foi capaz de detectar o amido de batata, trigo, mandioca e milho contidos na amostra, na fécula de batata, mostrada na imagem 10. O limite inferior de detecção foi 5 mg/kg (ppm).

Imagem 10 Amido e fécula presente na Farinha no limite de detecção 5 mg/kg (aumento 200X).





## 5 DISCUSSÃO

As fotomicrografias foram produzidas com o objetivo de registrar a imagem 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 estudo ou pelo simples fato de ilustrar. Santos (2011), utiliza da fotomicrografia para estudos taxonômicos de insetos.

Considerando os resultados da microscopia em comparação com a lista de ingredientes declarados pelo fabricante, tanto nos produtos declarados, contém ou não contém glúten, constatamos que todos os alimentos farináceos apresentaram glúten ingredientes não descritos no rótulo, comprovando a não autenticidade do produto. 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 (BRASIL,1990a). Estas são informações úteis e necessárias para que o consumidor possa fazer opção de compra, de acordo com suas necessidades e peculiaridades. Segundo Valente (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.

Os celíacos transgridem a dieta por vários motivos: falta de orientação sobre a doença e suas complicações; descrença na quantidade de cereais proibidos (qualquer quantidade é prejudicial e agressiva aos celíacos); dificuldades financeiras, pois os alimentos permitidos são os de custo mais elevado; dificuldade de modificar os hábitos alimentares; falta de habilidade culinária para preparar alimentos substitutivos; forte pressão da propaganda dos produtos industrializados que contêm glúten; rótulos, embalagens ou bulas que nem sempre contêm a correta ou clara composição dos ingredientes (ZANDONADI,2006). De acordo com Sdepanian e colaboradores (2001), a 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 aveia. A Lei Nº10.674, 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.

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

Das dez amostras de Farinhas que são alimentos naturalmente livres de glúten que deveriam conter em seus rótulos grafado “não contém glúten” temos informações distintas declaradas no rótulo. Nas cinco amostras declaradas pelo fabricante não contém glúten foi detectado trigo em quatro amostras, centeio em duas amostras e aveia em uma. Nas outras cinco amostras declaradas pelo fabricante contém glúten foi detectada a presença de trigo em quatro amostras, centeio em duas amostras, cevada em uma amostra. 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 glúten. A inadequação acerca da rotulagem de produtos que contêm glúten é preocupante, pois a presença do glúten é prejudicial para portadores da DC, que consiste em uma intolerância permanente a proteína do trigo, cevada, centeio e aveia.

A presença de outros ingredientes detectados sugere a presença de contaminação cruzada por falta de boas práticas de fabricação, deve ser considerada, pois os pacientes celíacos possuem individualidades imunológicas e alguns podem ser susceptíveis a uma quantidade menor que 20mg/kg. Segundo Johnson e colaboradores (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, 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; 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 Pires (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 realização de um ensaio de confirmação que caracteriza a proteína (KENT-JONES, AMOS apud FLINT; JOHNSON, 1979).

No quadro 12, das cinco amostras declaradas no rótulo não contém glúten, analisadas pelo método ELISA, em quatro das amostras 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. No quadro 13 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 mesmo 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 (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 glúten (LEDERMAN, 2013).

No Brasil existe pouca diversidade de alimentos com um limite de 20 mg/kg possivelmente com o aumento no rigor do limite para 10 mg/kg, buscado pela Consulta pública Nº 29 de 05 de junho de 2014, leve a uma diminuição ainda maior da diversidade de produtos no mercado. 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 a população celíaca o consumo de alimentos antes proibidos (SILVA, 2010).

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, são 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 movimenta mais de 10 bilhões de dólares por ano (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 (THOMPSON; MENDEZ, 2008; SILVA, 2010).

É fundamental não apenas regulamentar alimentos, mas fazer a indústria de alimentos cumprir a legislação, através da rotulagem que garanta a veracidade das informações e sua comprovação e conseqüentemente 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 declarações feitas nos rótulos não são suficientes.

## **6 CONCLUSÕES**

A produção de fotomicrografias gerou material de referência para a comparação na identificação das características morfológicas dos diferentes amidos detectados por microscopia nas amostras estudadas.

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 rápida da presença de glúten através da detecção de amido nas diferentes espécies de cereais que contém glúten. É um método confiável, sensível, com seletividade e limite de detecção conformes e de grande relevância dada a sua concordância satisfatória com o método preconizado, ELISA, pelo Codex Alimentarius.

### **PERSPECTIVAS**

A perspectiva é estender o estudo de validação do método, determinando sua especificidade e sensibilidade utilizando amostras negativas, no entanto, estas são difíceis de conseguir devido às contaminações cruzadas.

## REFERÊNCIAS

- AAFM - AMERICAN ASSOCIATION OF FEED MICROSCOPISTS. **Manual of Microscopic analysis off feedstuffs**. 2.ed. 1978,174 p.
- ABAD, A. et al. Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: an analytical comparison. **J Chromat A** , v. 833, p. 3-12, 1999.
- ABDULKARIM, A.S. et al. Etiologia da doença celíaca sem resposta: resultados de uma abordagem sistemática. **Am. J. Gastroenterol**, v.97, n.8, p.2016-21, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263982>. Acesso em: 12/5/2013.
- ACELBRA. Associação dos Celíacos do Brasil. Leis a favor dos celíacos. Disponível em: <http://www.acebra.org.br/english/leis.php>. Acessado em 13/09/2014.
- ALMEIDA, L. M. M. C. et al. Políticas públicas, redes de segurança alimentar e agricultura familiar: elementos para construção de indicadores de eficácia. **Estudos Sociedade e Agricultura**, Rio de Janeiro, v. 14, n.2, p. 205-235, 2006.
- AMBONI, R. D. M. C.; DE FRANCISCO, A.; TEIXEIRA, E. Utilização de microscopia eletrônica de varredura para detecção de fraudes em café torrado e moído. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.19, n.3, set.- dez. 1999.
- AMBROSI, I. Aspectos econômicos da cadeia produtiva de trigo no Brasil. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000.
- ANWAR A.J.; WALKER J.D.; FRIER B.M. Type 1 diabetes and Down's syndrome: prevalence, management and diabetic complications. **Diabet Med.**, v. 15, n.2, p.160-3, 1998.
- AUSTRALIA, NEW ZEALAND, CODEX. Food Standards Australia New Zealand and CODEX Standards Issue 103, Standard: 1.2.8 Clause 16, 2008.
- BAKKALOGLU, A. et al. Down syndrome associated with systemic lupus erythematosus: a mere coincidence or a significant association? **Clin Genet.**, v. 46, p.322-3,1994.
- BATISTA, M. Instituto Materno Infantil de Pernambuco, Recife, Brasil. Da fome à segurança alimentar: retrospecto e visão prospectiva. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p. 872 - 873, 2003.
- BERGE-HENEGOUWEN G.P.; MULDER C.J.J. Pioneer in the gluten free diet: Wille-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. **Gut**, v.34, n.11, p. 1473-75, 1993.
- BEUX, M.R. Atlas de Microscopia Alimentar. Identificação de elementos histológicos vegetais. São Paulo: Livraria Varela, 1997.80 p.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F.O. Química do processamento de alimentos. 3.ed. São Paulo: Varela, 2001. 478 p.
- BONAMICO M. et al. Prevalence and clinical picture of celiac disease in Italian Down syndrome patients: a multicenter study. **J Ped. Gastroenterol Nutr.**, v. 33, p. 139-43, 2001.



- BRADBURY, S. "An Introduction to the Optical Microscope", Royal Microscopy Society, microscopy Handbooks 01, Oxford Science Publications, 1989.
- BRANDT, K. G.; SILVA G.A. P. Soroprevalence of celiase disease in at a general pediatric ocupatient clinic. **Arq. Gastroenterol**, v.45, n.3, p.239-242, 2008.
- 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.
- BRASIL. Congresso Nacional. Constituição Federal, de 05 de outubro de 1988. Constituição da República Federativa do Brasil. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 05 out. 1988.
- 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.
- BRASIL. Congresso Nacional. Lei N° 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 set.1990b.Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l8080.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm). Acessado em: 08 jan.2013
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei Federal nº8.543, de 23 de dezembro de 1992. Determina a im pressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten, a fim de evitar a doença celíaca ou síndrome celíaca. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 dez. 1992. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/eb747b004ac01daa95d7bfa337abae9d/Lei\\_n\\_8543\\_de\\_23\\_de\\_dezembro\\_de\\_1992.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/eb747b004ac01daa95d7bfa337abae9d/Lei_n_8543_de_23_de_dezembro_de_1992.pdf?MOD=AJPERES). Acessado em: 05 jan. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Portaria N° 1.428, de 26 de novembro de 1993. Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, Diretrizes para o Estabelecimento Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviço na Área de Alimentos e o Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrões de Identidade e Qualidade para Serviços e Produtos na Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2 dez. 1993.supl. 229, p.18415, Seção 1.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Diário Oficial da União, Brasília, DF,13 de março de 1998a.seção1. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2a1d950047458eca97dbd73fbc4c6735/PORTARIA\\_29\\_1998](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2a1d950047458eca97dbd73fbc4c6735/PORTARIA_29_1998). Acessado em:05 jan 2013.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carnes e Produtos Cárneos", constante do Anexo desta Portaria. Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 22 de março de 1999b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ffab898045a945eb9ba89fa9166895f7>

/Portaria+n%C2%BA+1004,+de+11+de+dezembro+de+1998. Acessado em : 11 jan. 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 40, de 8 de fevereiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de alimentos e bebidas embalados que contenham glúten, Diário Oficial da União. Brasília, DF, 13 fev. 2002a. Disponível em : [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6d1e01804ac01f8195e0bfa337abae9d/Resolu%C3%A7ao\\_RDC\\_n\\_40\\_de\\_08\\_de\\_fevereiro\\_de\\_2002.pdf?MOD=AJP](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6d1e01804ac01f8195e0bfa337abae9d/Resolu%C3%A7ao_RDC_n_40_de_08_de_fevereiro_de_2002.pdf?MOD=AJP) ERES. Acessado em: 05 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 259, de 20 de setembro de 2002. Regulamento Técnico Para Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 set.2002b Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/36bf398047457db389d8dd3fbc4c6735/RDC\\_259.pdf?MOD=AJP](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/36bf398047457db389d8dd3fbc4c6735/RDC_259.pdf?MOD=AJP) ERES Acessado em : 05 jan 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei n 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](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/110.674.htm). Acessado em :05 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 137, de 29 de maio de 2003. Regulamento Técnico Para informações contidas nas bulas e embalagens. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 set. 2003b. Disponível em: [http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucao\\_sanitaria/137.pdf](http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucao_sanitaria/137.pdf). Acessado em: 05 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº. 11.346, de 15 de setembro de 2006. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de setembro de 2006. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2006/lei/11346.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/11346.htm) Acessado em: 06 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 307, de 17 de setembro de 2009. Dispõe sobre o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Celíaca. Disponível em: [bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2009/prt0307\\_17\\_09\\_2009.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2009/prt0307_17_09_2009.html). Acessado em :13 set.2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n 29, de 05 de junho de 2014. Dispõe sobre Rotulagem de Alergênicos em Alimentos. Diário Oficial da União, DF, 09 jun. 2014. Disponível em: [http://www.idec.org.br/uploads/audiencias\\_documentos/anexos/propostaemconsulta.pdf](http://www.idec.org.br/uploads/audiencias_documentos/anexos/propostaemconsulta.pdf). Acessado em 10/10/2014.

BUSHARA, K.O. Neurologic presentation of celiac disease. **Gastroenterology**, v.128, n.4, supl 1, p. 92-7, abr.2005.

CAMERON R.E.; DONALD A. **M. Polymer**.v. 33, p.2628, 1992.

CANADA, Food and Drug Regulation Division 24, Sets out specific regulations that apply to “Foods for Special Dietary Use”. Session B.24.018 – gluten-free food 2012.

- CATASSI, C. et al. Dose dependent effects of protracted ingestion of small amounts of gliadin in coeliac disease children: a clinical and jejunal morphometric study. **Gut**, v.34, p.1515–19, 1993.
- \_\_\_\_\_. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. **Lancet**, v.343, ed. 8891, p. 200– 03, 1994.
- \_\_\_\_\_. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for celiac disease in school-age subjects. **Acta Paediatr**; v. 85, ed.s.412, p. 29-35, 1996.
- \_\_\_\_\_. Toxicity of Gluten Traces in Patients on Treatment for Celiac Disease. Results of a Prospective, Placebo-controlled, Double-blind, Randomized Study (Abstract). Digestive Disease Week, 14–19 May 2005, McCormick Place, Chicago, IL, USA. Bethesda, MD: American Gastrointestinal Association, 2005.
- CAVALLI, S. B. Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. **Rev. Nutr.**, v.14, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732001000400007> . Acessado em: 12 mai 2014.
- CEREDA, M. P. Amidos Modificados. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n.1, p.31-36, 1996.
- CEREDA, M. P. et al. Propriedades Gerais do Amido. Campinas: Fundação Cargill. v. 1. , 2001. 224 p.
- CICLITIRA, P.J. et al. Clinical testing of gliadin fractions in coeliac patients. **Clin. Sci.**, London., v. 66,p. 357–64,1984.
- CLAYTON, E. G.; HASSALL, A. H. **A compendium of food-microscopy with sections on drugs, water, and tobacco**. London: Baillière, Tindall and Cox, 1909. 488p.
- 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.
- CORNELL, H. The chemistry and biochemistry of wheat. In: CAUVAIN, S. P. (Ed). Bread Making: improving quality. Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.
- CORRADINI, E. et al. Estudo Comparativo de Amidos Termoplásticos Derivados do Milho com Diferentes Teores de Amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n 4, p. 268-73, 2005.
- COSTA, E. A. Vigilância sanitária: proteção e defesa da saúde. 2. ed. aumentada, Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos, São Paulo, 2004.
- COSTA, R.J. Técnica de Biologia Molecular: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), 2009.Disponível em: <https://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/8577/tecnica-de-biologia-molecular-pcr-reacao-em-cadeia-da-polimerase>. Acessado em 12 de dezembro de 2014.
- 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.
- DEUTSCH, H. et al. Labeling and regulatory issues. In: ARENDT, E. K.; BELLO, F. D. (Ed). Gluten-free Cereal Products and Beverages. Elsevier Inc, 2008.

- DIETERICH, W. et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. **Nature Med.**, v.3, p.797-801, 1997.
- 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.
- EIROA, M. N.U. Investigação de surtos de toxinfecções bacterianas causados por alimentos processados. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.2, 1989.
- EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr. Guideline on bioanalytical method validation, 2011. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf). Acessado em: 13/09/2014.
- EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EC) No 41/2009. Concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten. Journal of the European, 2009.
- EVANGELISTA, J. Tecnologia de alimentos. São Paulo: Atheneu; 1989. 652p.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v., p. 614-615.
- FASANO, A. et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. **Arch Intern Med.**, v.163, p. 286-92, 2003.
- FASANO A.; CATASSI C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. **Gastroenterology**, v. 120, p.636– 651, 2001.
- FENACELBRA. Federação Nacional das Associações de Celíacos do Brasil. Alimentos Seguros para os Celíacos; Disponível em: [http://www.fenacelbra.com.br/ancelbra\\_joinville/campanha-alimentos-seguros-para-os-celíacos/](http://www.fenacelbra.com.br/ancelbra_joinville/campanha-alimentos-seguros-para-os-celíacos/). Acessado em 13/09/2014.
- FENG, P. Rapid Methods for detecting food borne pathogens. In food and Drug administration. Bacteriological analytical manual. 8 ed. Gathusburg: AOAC Internacional, v.1, 1995.
- FLINT, O.; JOHNSON R. F. P. Histochemical Identification of Commercial Wheat Gluten. **Analyst**, v. 104, p. 1135-37, 1979.
- FLINT, O. Microscopía de los alimentos. Manual de métodos prácticos utilizando La microscopía óptica. Zaragoza: Ed. Acríbia, 1996.
- FRAQUEZA, M. J. Rapid methods applied to microbial food control. Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, p. 279-278, 2002.
- FREITAS, F. O. Uso de Grãos de Amido na Identificação e Análise de Materiais Arqueológicos Vegetais. In: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; n. 23, Brasília, 2002.26p.
- FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. J. Anim. Sci, v.37, n.4, p.1048-61, 1973.
- 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.

- GALLIARD, T. Starch: properties and potential. (S. L.): Society of Chemical Industry, 1987.
- GANDOLFI, L. et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. **Am J Gastroenterol**, v. 95, p.689-92, 2000.
- GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Qualidade das matérias-primas. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3.ed. Baueri: Manole, 2008.
- \_\_\_\_\_; Higiene e vigilância Sanitária de alimentos. 4ed. Barueri: Manole, 2011.p.
- \_\_\_\_\_; BOANOVA, A.B.; GERMANO, M.I.S. Direito do Consumidor: Larva em bombom gera indenização por danos morais. **Rev Direito Sanit**, v. 10,n.2, p.166-82,2009.
- GUANDALINI, S. Celiac disease in the new world. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v.31, p.362-4, 2000.
- GUEVARA, G.P. Enfermedad celíaca. **Rev. Chil Pediatr**, v. 73, n.4, p. 394-7, 2002
- GUILBOT, A.; MERCIER, C. Starch. In: ASPINALL, G.D. The polysaccharides. New York: Academic Press, v.3, p.229-285, 1985.
- GUTIÉRREZ, J.A.F. et al. Physicochemical Properties of casein-starch interaction obtained by extrusion process. **Starch**, v.56, n. 5, p. 190-198, 2004.
- GREEN, P.H; CELLIER C. "Celiac disease". **N Engl J Med**.,v.357, n. 17, p. 1731–43, 2007
- GREENISH, H.G. The Microscopical Examination of Foods and Drugs: A Practical Introduction to the Methods Adopted in the Microscopical Examination of Foods and Drugs, in the Entire, Crushed and Powdered States. Oxford University: Ed. J. & A. Churchill, 1903. 321p.
- GREENISH, H.G.; COLLIN, E. An Anatomical Atlas of Vegetable Powders, Designed as an Aid to the Microscopic Analysis of Powdered Foods and Drugs ...With 138 Original Illustrations. Ed. London, 1904. 287p.
- HAJDENWURCEL, J.R.; SOUZA.H.M. Avaliação de Método Simplate para contagem de coliformes fecais totais e E. coli em leite fluido. **Indústria de Laticínios**, v.3, n.18, p.71-72.1998.
- HASSALL, A. H. Adulteration detected in food and medicine. London. Longmans, Green and Co.,1857.
- HENTERICH, et al. Assayof gliadin by real–time immunopolymerase chainreaction. **Nahrung**. v.7, n.5, p. 345-828, 2003.
- HERTER, C.A. On infantilism from chronic intestinal infection; characterized by the overgrowth and persistence of flora in the nursing period. Nova Iorque: Macmillan and Co,1908.
- HIGSON, S. P. J. Química Analítica, São Paulo: McGraw-Hill, 2009. 4p.
- HILL I.D., et al. Coeliac Disease: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.35, n.2, p.78-88, 2002.

- HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p.253–267, 2001.
- HUSS, W. Microscopy and quality control in the manufacture of animal feeds. Frankfurt Umschau Verlag Breidenstein, 1975.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2012. Disponível em:<http://www.inmetro.gov.br/qualidade/comites/codex.asp> Acessado em 13/09/2014
- JANE, J. et al. Effect of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**.v.76, p.629-637, 1999.
- JOHNSON, P. E. et al. Detection of Allergens in Food. In: HENGEL, A. J. V. (Ed). Food Allergens, Analysis, Instrumentation and Methods. Boca Raton: CRC Press LLC, 2011.
- KHAJARERN, J. et al. Manual of feed microscopy and quality control. American Soybean Association, 1987. 161p.
- KOSSMAMN, J.;LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*. v.19, n.3, p.171-226, 2000.
- KOTZE, L.M.S. Distúrbios entéricos da absorção. In: Dani R. Gastroenterologia essencial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.211-24, 1998.
- LANDABURO R.V., PÉREZ F.S. Celiaquía: nuevos rostros de una antigua enfermedad. **Medicentro**, v.6, n.2, 2002.
- LANDIS, J.R., KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, p.159–174, 1977.
- LEACH, H. W.; McCOWEN, L.D.; SCHOCH, T.J. Structure of the starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches. *Cer Chem.*, v. 36. n.6, p.534 – 44, 1959.
- LEDERMAN, J. Freedom Foods: “gluten-free – should always mean free from gluten” 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.
- LEFFLER, D.A. et al. Etiologias e preditores de diagnóstico da doença celíaca nonresponsive. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 5, p. 445-50, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263982>. Acessado em: 13/05/2014.
- LEONEL, M.; JACKEY, S.; CEREDA, M. P. Processamento industrial de fécula de mandioca e batata doce - um estudo de caso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 343-345, 1998.
- LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**,Campinas, v. 27, n.3, p.579-88, 2007.
- LOSOWSKY,M. S. A history of coeliac disease. v.26, n.2, p.112-20. DOI: 10.1159/000116768. **Epub** 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431060>. Acessado em: 13/05/2013

- MELO S.B., et al. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Dig Dis Sci**, v.5, p.1020-25, 2006.
- MENEZES, J.B.F.J. Investigações sobre o exame microscópico de algumas substâncias alimentares. **Revista Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 9, p.18-77, 1949.
- MOLINA, A.L., TOBO, P. R. Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico, 2004. Disponível em: [www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf](http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf), Acessado em 12 dez 2014.
- MUÑOZ-OLIVAS, R. Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses. **Tren Anal Chem**, v. 23, n. 3, p. 203-16, 2004.
- MORAIS, M. B.;SDEPANIAN, V.L.; NETO,U.F.Doença Celiaca.**Nutr.Pauta**,v.51,p.30-2, 2001.
- MORAIS, C. M. Q. J. et al. Análise de glúten em diversos alimentos industrializados: rotulagem inadequada para a população celíaca. In: XVIII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos – ENAAL e IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, São Paulo: ENAAL,2013; São Paulo: SBALL, 2013.
- MORAIS, M.B. Detecção de glúten em alimentos consumidos por crianças com doenças celíaca. Escola Paulista de Medicina (EPM). Universidade de São Paulo. São Paulo, 1998. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/13581/deteccao-de-gluten-em-alimentos-consumidos-por-criancas-com-doencas-celiaca/> Acessado em : 13 mar. 2013
- NISHIHARA RM, KOTZE LM, MOCELIN V et al. Serological investigation of celiac disease in southern area from Brazil. **Arq Gastroenterol**. 2005.
- NUNES, L.B.; SANTOS, W. J.; CRUZ, R.S. Rendimento de extração e caracterização química e funcional de féculas de mandioca da região do semi-árido baiano. **Alim. Nutr**. Araraquara, v. 20, n.1, p129-34, 2009.
- OLIVEIRA, RP et al. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.19, p.43-9, 2007.
- OLSON, J.C. et al. Arthropathy of Down syndrome. **Pediatrics**, v.86, p. 931-6, 1990.
- PANDOLFI, R. et al. A verdade sobre o glúten. **Super interessante**. Imprensa Gráfica Abril, 2014.
- PARKER, R.; RING, S.G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v.34, p.1-17, 2001.
- PAVELEY, W.F. From Arateus to Crosby: a history of celiac disease. **Brit Med J**, v. 297, p.1646-9, 1989.
- PEDROSO R.A., DEMIATE I.M. Avaliação da influência de amido e carragena nas características físico-químicas e sensoriais de presunto cozido de peru. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 28(1): 24-31, 2008.
- 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.

- PEREIRA, M.A. et al. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. **World J Gastroenterol**, v. 28, n.12, supl.40, p.6546-50, 2006.
- PERLMUTTER, D. A dieta da mente . Editora Paralela, 2014 ISBN8580869846. *Disponível em:* <https://books.google.com.br/books?isbn=8580869846>. Acessado em 12 dez.2014.
- PIRES, B. A. D. Análise qualitativa de glúten em alimentos: Métodos Imunoquímicos e Moleculares. Dissertação de Mestrado em Vigilância Sanitária, FIOCRUZ-INCQS, 2013.
- POLANCO, I. Enfermedad Desafio. In: Argüelles F, Polanco I, ed. Manual de gastroenterología pediátrica. Granada: Copartgraf, p.261-8,1996.
- POMERANZ, Y. Modern Cereal Science and Technology. New York: VCH Publishers, 1987.
- QUAGLIA, G. Ciencia y tecnologia de la panificación. Zaragoza: Acribia, 1991. p.
- RAUEN, M. S.; BACK, J. C. V.; MOREIRA, E. A. M. Doença celíaca: sua relação com a saúde bucal. Campinas, **Rev. Nutr.** : v.18, n. 2, 2005.
- RATNAYAKE, W.S.; JACKSON, D.S. A new insight into the gelatinization process of native starches. *Carbohydrate Polymers*, v.67, n.4, p.511-529, 2007
- RIOS, E.A. et al. Avaliação da sensibilidade da prova do amido em leite pasteurizado. 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Florianópolis, 2011.
- RODRIGUES, R. M. M. S. et al. Métodos de análise microscópica de alimentos. São Paulo: Letras e Letras, 1999. p.
- ROESSLER, J.L. et al. Enfermedad celíaca ver el adolescente y adulto joven. Revista Desafio para gastroenterólogos de niños y adultos. **Revista Méd Chile**. v.129, n.7, p.743-8, 2001.
- ROMALDINI, C.C., BARBIERI, D. Anticorpos séricos na doença celíaca. **Arq Gastroenterol.**, v. 36, n.4, p. 258-64, 1999.
- ROZENFELD, S. (organizadora). Fundamentos da Vigilância Sanitária FundaçãoOswaldo Cruz.ISBN: 85-85676-73-6, 2009.
- RUBIN, C.E. et al. Studies of celiac disease.The apparent identical and specific nature of the duodenal and proximal jejunal lesion in celiac disease and idiopathic sprue. **Gastroenterology**, v.38, p.28, 1960.
- RUBELLO, D. et al. Natural course of subclinical hypothyroidism in Downsyndrome: prospective study results and therapeutic considerations. **J Endocrinol Invest**. v.17, p. 35-40, 1995.
- RUMBO, J.D. Consumer resistance in a world of advertising clutter: the case of adbusters. **Psychology and Marketing**, v. 19, n.2, p. 127–148, 2002.
- SANCHES, R.L. et al. In house validation of a method for detection of animal meals in ruminant feeds by microscopy. **Food Control**, v. 17, p. 85-72, 2006.
- 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.
- SCHEUER, P.M.; FRANCISCO, A.; MIRANDA, M.Z.; LIMBERGE, V.M. Trigo: características e utilização na panificação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.13, n.2, p. 211-222, 2011.
- SDEPANIAN, V.L.; MORAIS, M.B.; NETO, U.F. DOENÇA CELÍACA: a evolução dos conhecimentos desde sua centenária descrição original até os dias atuais. **Arq. Gastroenterol**, São Paulo, v.36, n.4, out.-dez.,1999.
- 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.
- SDEPANIAN, V.L et al. Pesquisa de gliadina em medicamentos - informação relevante para a orientação de pacientes com doença celíaca. **Arq Gastroenterol**, v. 38, n.3, p.176-82, 2001.
- SHANK F.R.; CARSON, K.L. The regulatory environmental past and future – incentive or impediment to developments in food science and technology: a perspective from FDA. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.34, n.2, Mar, 1994.
- SILVA, G.O. et al. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 188-197, jan./mar. 2006.
- SILVA, N. Novos Métodos análise microbiológica de alimentos. **Coletânea ITAL**, v. 25, n.1, p.1-13,1996.
- 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.
- SIPAHI, A.M. Detecção e quantificação de glúten em alimentos industrializados por técnica de ELISA. Faculdade de Medicina (USP). São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/25841/deteccao-e-quantificacao-de-gluten-em-alimentos-industrializados-por-tecnica-de-elisa>. Acessado em: 05 mai 2013.
- SKERRITT JH, HILL AS. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. **Assoc Off Anal Chem**, v. 74, n.2, p.257-64,1991.
- 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.
- SPERS, E.E., KASSOUF, A.L. A abertura de mercado e a preocupação com a segurança dos alimentos. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.10, n.46, p.16-26, 1996.
- STERN M, CICLITIRA PJ, VAN ECKERT R et al. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.13, n.6, p.741-7, 2001.
- STRINGHETA, P.C. et al. A propaganda de alimentos e a proteção da saúde dos portadores de doença celíaca. **Hospital Universitário Revista**, Juiz de Fora, v.32, n.2, p.43-46, 2006.

- TESTER, R.F.; KARKALAS I.; QI, X. Review-Starch- Composition, fine structure and architecture. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, p.151-165, 2004.
- 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
- THOWAS, D.J.; ATWEL, W. Practical for guides the food industry. Starch, Saint Paul: Eagan Press, 1999.
- TOSI, P. et al. Annals of Botany, Oxford Journals, v. 108, n. 1, 2011.
- TRONCONE, R., GRECO, L., AURICCHIO, S. Gluten-sensitive enteropathy. **Pediatr Clin**, North Am, v. 43, p.355, 1996.
- USA. Food and Drug Administration, Questions and Answers: Gluten-Free Food Labeling Final Rule. Disponível em :<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Allergens/ucm362880.htm> Updated August 5, 2014) Acessado 13 out.2014.
- 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.
- VALDÉS, I. et al. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.15, n. 7, p.465-74, 2003.
- VALENTE, F.L.S.V. Do combate à fome à segurança alimentar e nutricional: o direito à alimentação adequada. **Cortez**, São Paulo, 2002.
- VANDEPUTTE, G.E.; DELCOUR, J.A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v.58, p.245-66, 2004.
- 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.
- VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of ruminant: ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fiber. Ithaca: Cornell University Press, 1994.
- VEYRET, Y. Os riscos: O homem com agressor e vítima do meio ambiente: São Paulo: Contexto, 2007.
- WALLIS, T.E. Analytical microscopy, its aims and methods, Ed. London, E. Arnold & Co., Wisconsin University – Madison. 1923.149p.
- WALKER-SMITH J, MURCH S. Coeliac the disease. In: \_\_\_\_\_. Diseases of small intestine in childhood. 4th ed. Oxford: Isis Medical Media Ltda, p.235-77, 1999
- WETIZ, J.C.V et al. Determinación de anticuerpos anti-transglutaminasa en el diagnóstico de enfermedad celíaca. **Rev Méd Chile**, p.131, v.1, p.25-9, 2003.
- WHO. Traditional medicine and modern health care-Progress report by Director-General. Forty fourth world health assembly 22 March, 1991.

- WHO. World Health Organization. Fact Sheet nº 237, 2002.
- WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiol.** v.24, n. 2, p.115-9. 2007.
- WIESER, H. Detection of gluten. In: ARENDT, E.K. and DAL BELLO, F. (eds), *Gluten-free Cereal Products and Beverages*. San Diego: CA: Academic Press, p.47-80, 2008.
- WINTON, A.L.; WINTON, K.B. *The structure and composition of foods*. Vols I – IV. John Wiley, 1932-9.
- ZANDONADI R.P. *Psyllium como substituto de glúten*. Universidade de Brasília Faculdade de Ciências da Saúde Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana. Brasília, 2006. Disponível em: [http://crn1.org.br/images/teses/celiacos\\_renatapz.pdf](http://crn1.org.br/images/teses/celiacos_renatapz.pdf). acessado: 05 de jan.2013.
- YOUNG, H. Fractionation of starch. In: WHISTLER, RL; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Ed.). *Starch chemistry and technology*. 2. ed. Orlando, USA: Academic Press, p. 249-283, 1984.

## APÊNDICE A – FOTOS IDENTIFICAÇÃO DO AMIDO POR MICROSCOPIA ÓTICA DAS AMOSTRAS DE BISCOITOS E FARINHAS.

As fotos apresentadas abaixo foram elaboradas pela autora.

Imagem1 Amostra 1 (a) aumento 400X com luz polarizada; (b) aumento 200X.

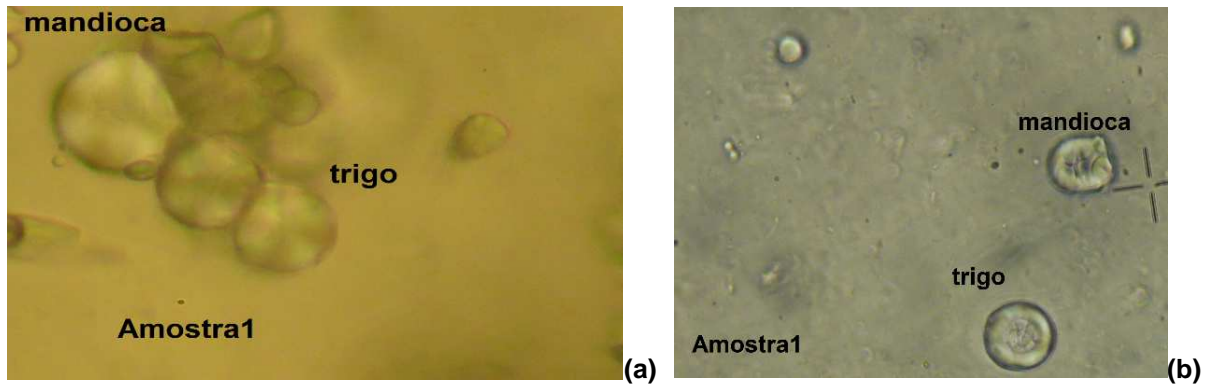


Imagem 2 Amostra 2 (a) aumento 200X; (b) aumento 400X.

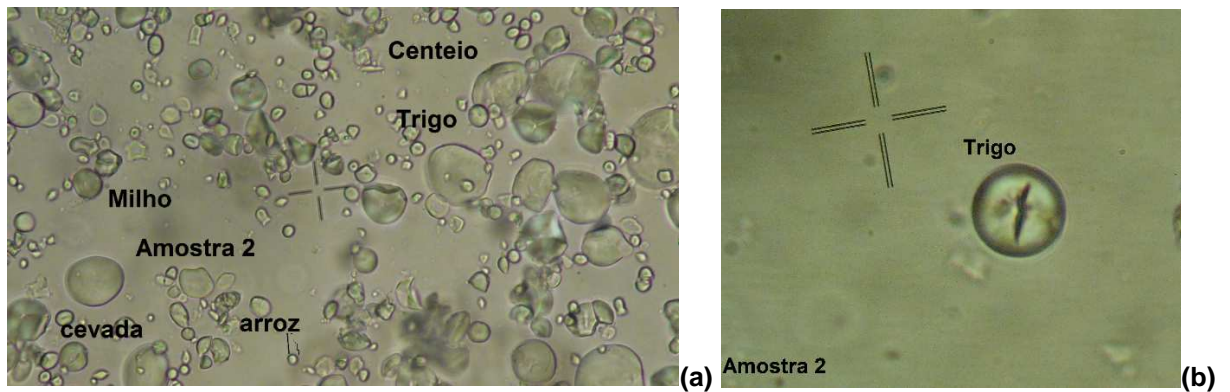


Imagem 3 Amostra 3 (a) aumento 200X; (b) aumento 200X com luz polarizada.

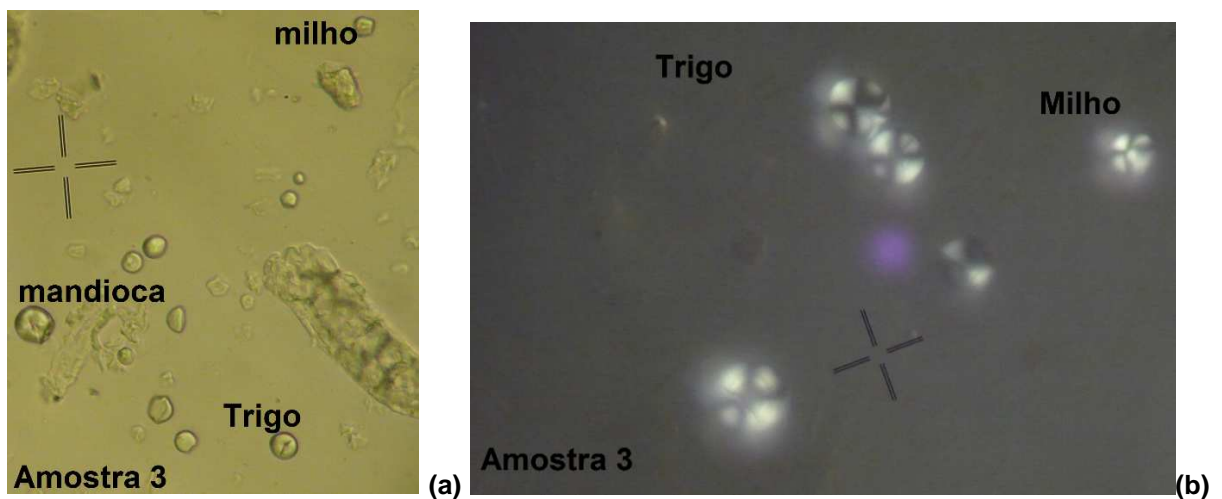


Imagem 4 Amostra 4 aumento 400X.

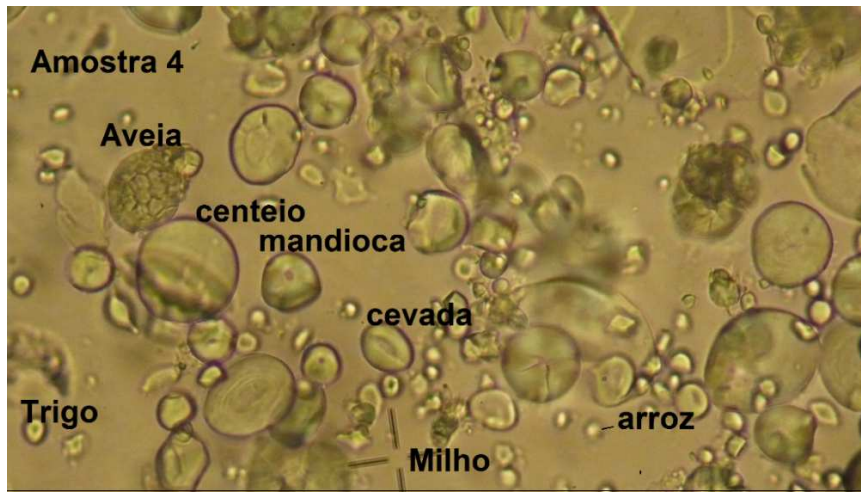


Imagem 5 Amostra 5 aumento 200X com luz polarizada.

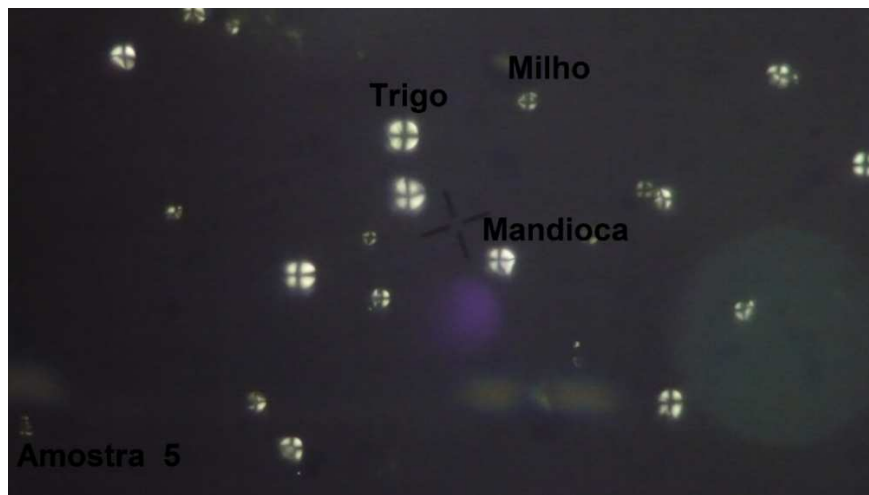
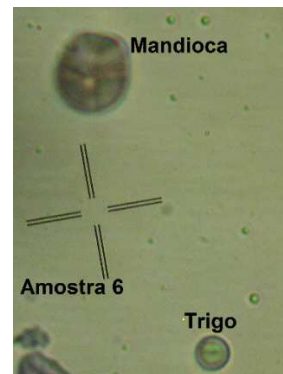


Imagem 6 Amostra 6 (a) aumento 200X; (b) aumento 200X.



(a)



(b)

Imagem 7 Amostra 7 (a) aumento 400X; (b) aumento 200X com luz polarizada.



Imagem 8 Amostra 8 (a) aumento 400X com luz polarizada; (b) aumento 200X com luz polarizada.

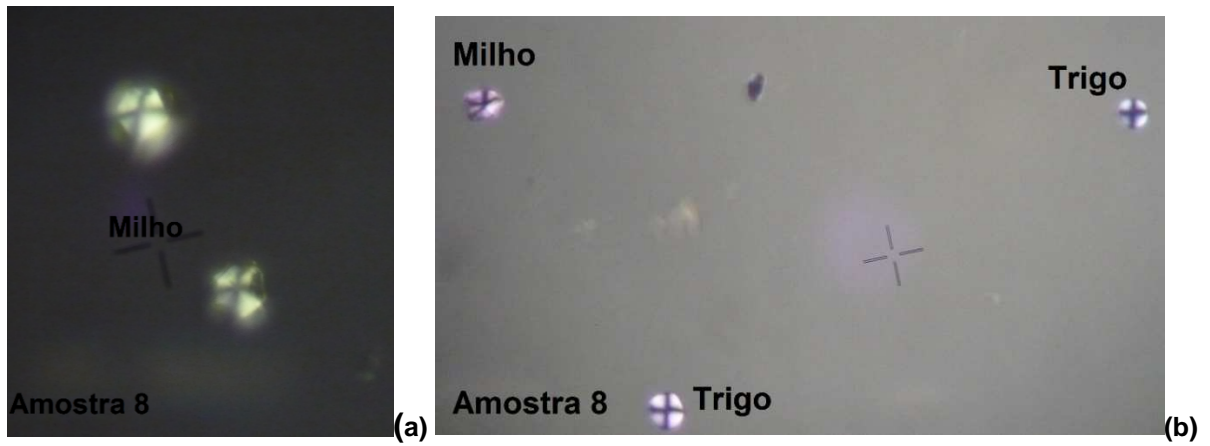


Imagem 9 Amostra 9 (a) aumento 400X; (b) aumento 400X com luz polarizada.

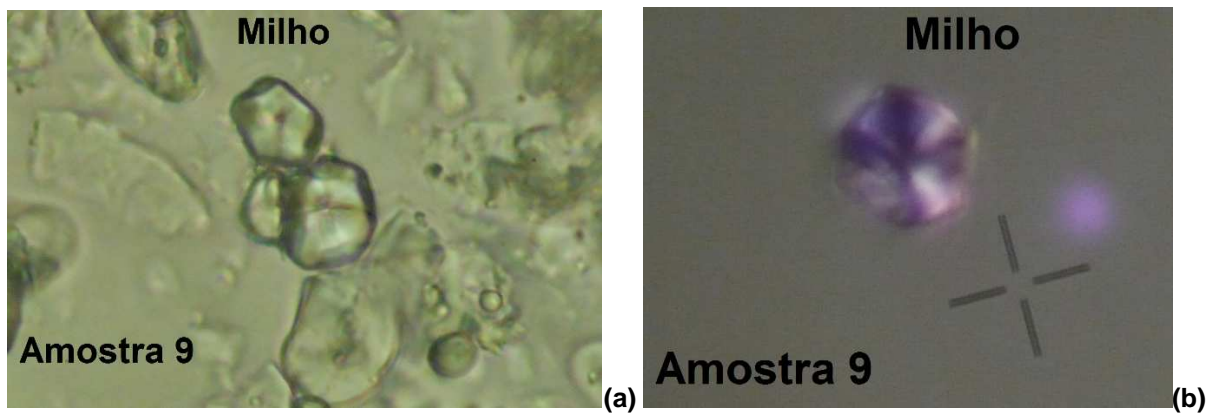


Imagem 10 Amostra 10 (a) aumento 200X com luz polarizada; (b) aumento 200X.

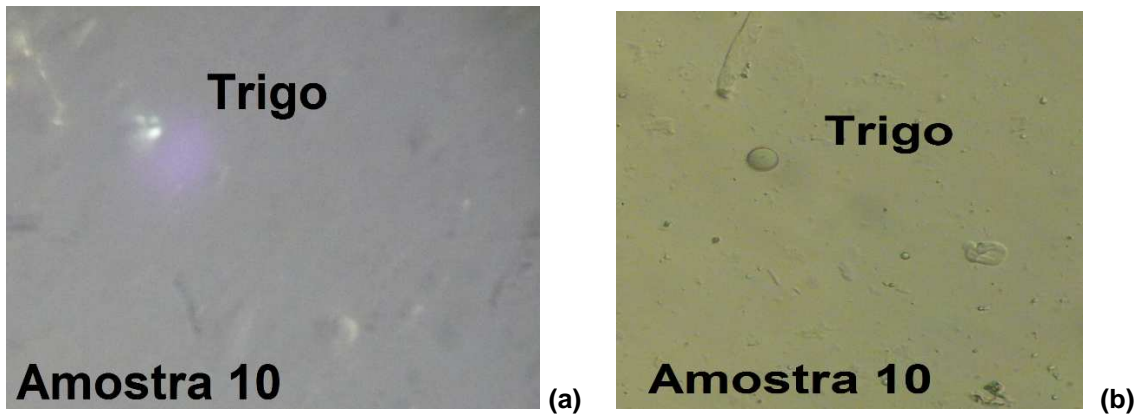


Imagem 11 Amostra 11 (a) aumento 200X; (b) aumento 400X.

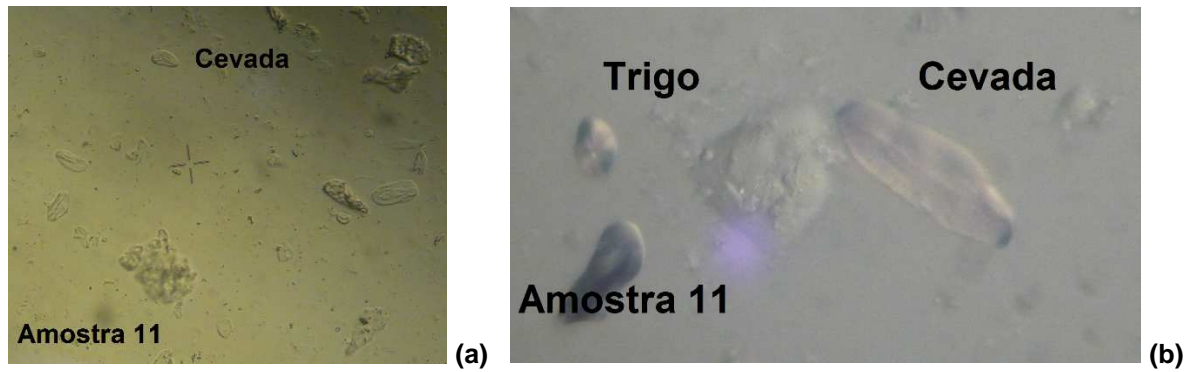


Imagem 12 Amostra 12 aumento 200X.

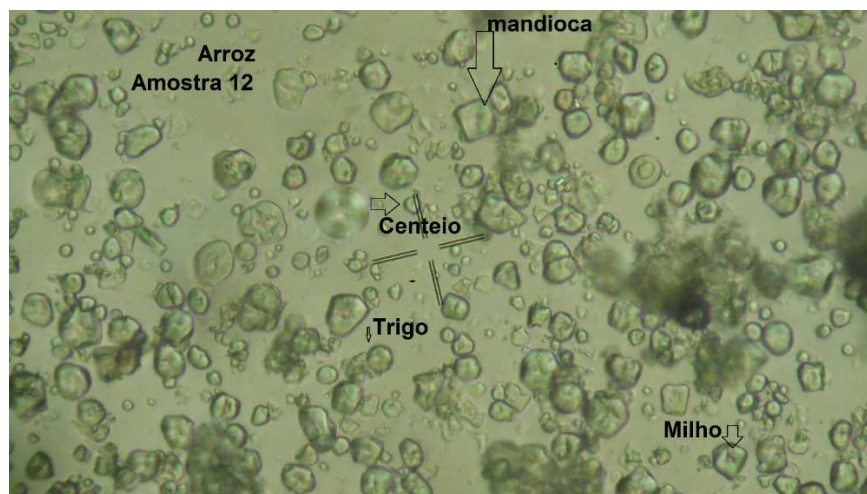


Imagem 13 Amostra 13 (a) aumento 400X; (b) aumento 400X com luz polarizada.

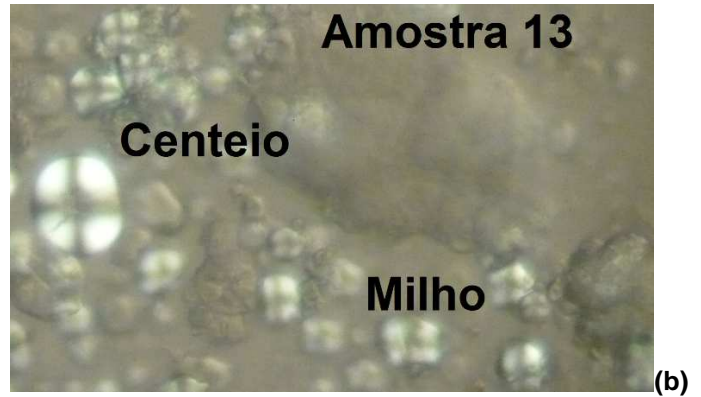
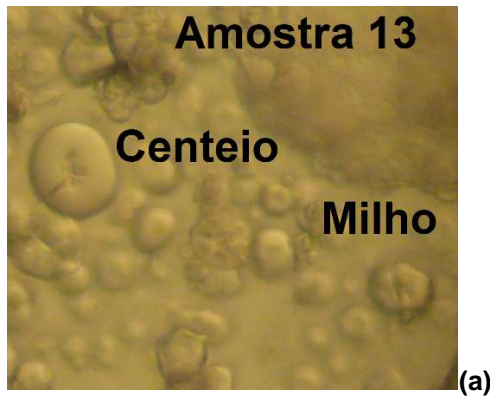


Imagem 14 Amostra 14 (a) aumento 400X; (b) aumento 200X com luz polarizada; (c) aumento 400X; (d) aumento 100X.

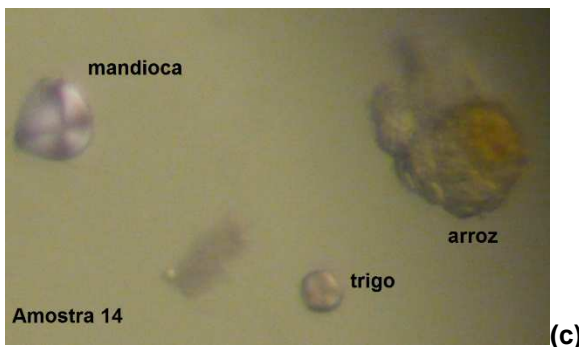
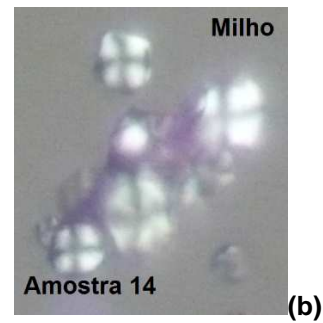
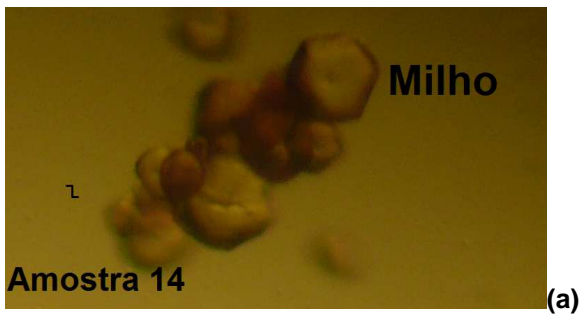




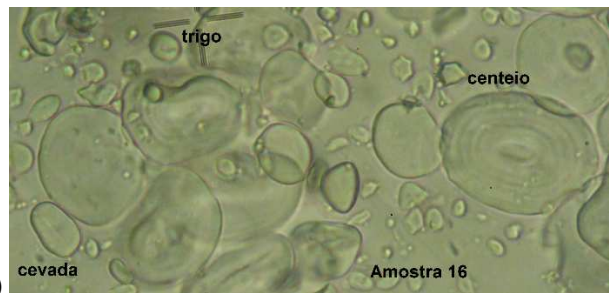
Imagem 15 Amostra 15 aumento 400X.



Imagem16 Amostra 16 (a) e (b) aumento 400X.



(a)



(b)

Imagem 17 Amostra 17 aumento 400X.



Imagem 18 Amostra 18 aumento 400X.



Imagem 19 Amostra 19 aumento 200X com luz polarizada.



Imagem 20 Amostra 20 aumento 200X.



Imagem 21 Amostra 21 (a) aumento 200X; (b) aumento 200X com luz polarizada.

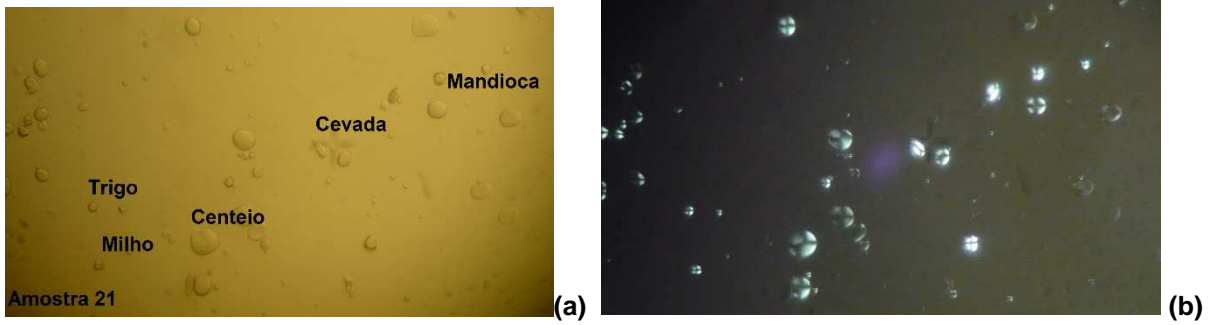


Imagem 22 Amostra 22 (a) aumento 400X; (b) aumento 400X com luz polarizada; (c) aumento 400X com luz polarizada; (d) aumento 400X.

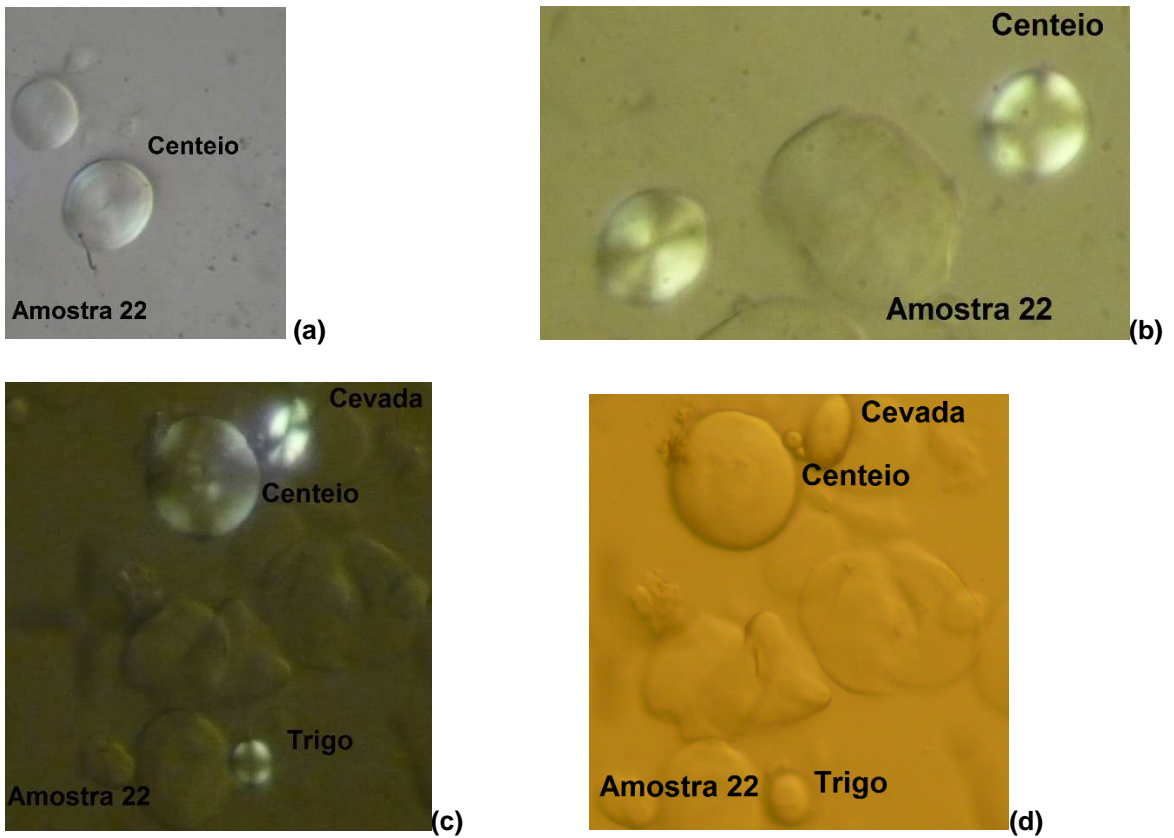


Imagem 23 Amostra 23 (a) aumento 200X; (b) aumento 200X com luz polarizada.

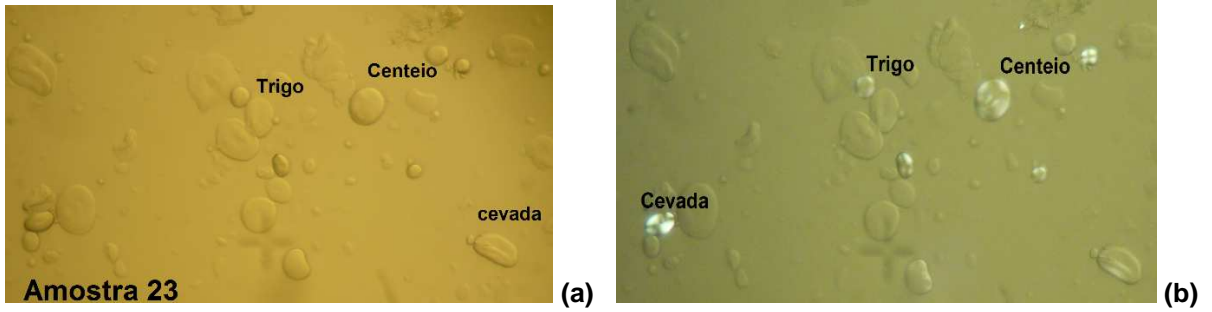


Imagem 24 Amostra 24 (a) aumento 200X com luz polarizada; (b) aumento 200X.

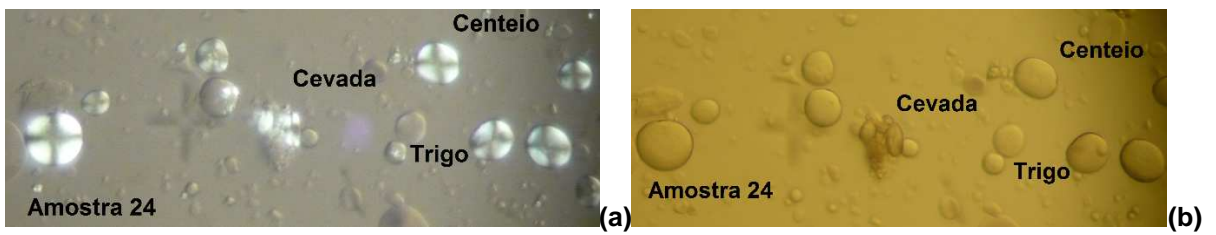


Imagem 25 Amostra 25 (a) aumento 200X; (b) aumento 200X com luz polarizada.

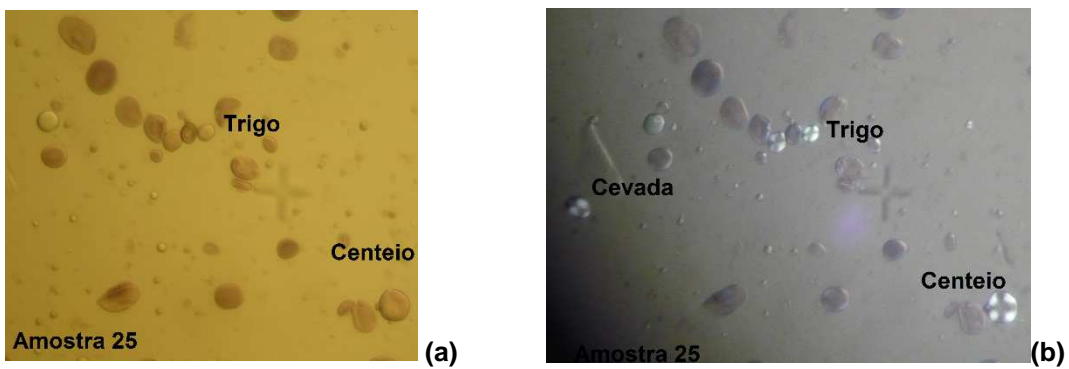


Imagem 26 Amostra 26 aumento 200X com luz polarizada.

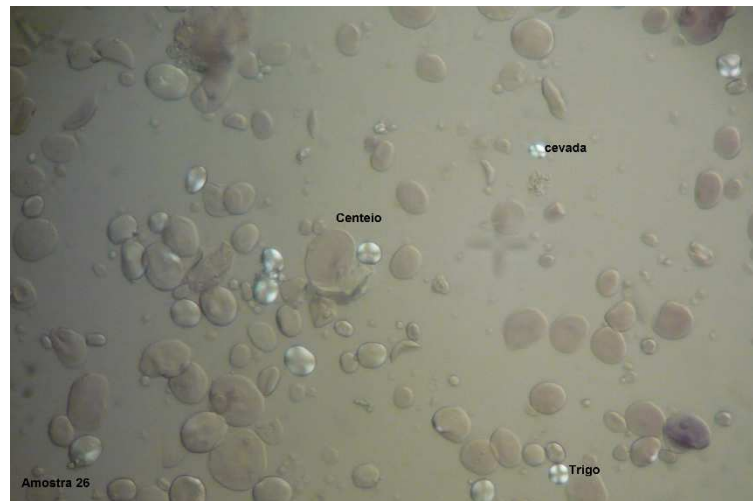


Imagem 27 Amostra 27 aumento 400X com luz polarizada.

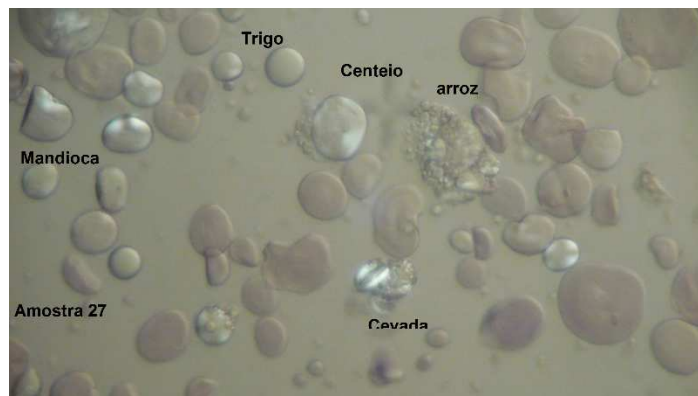
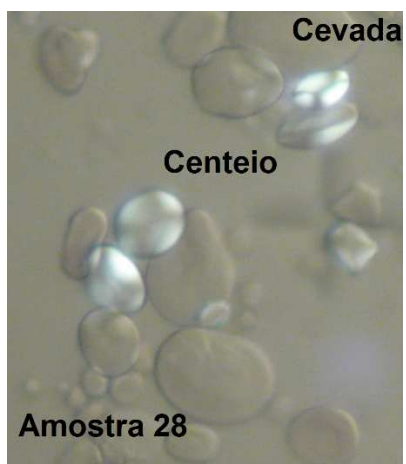
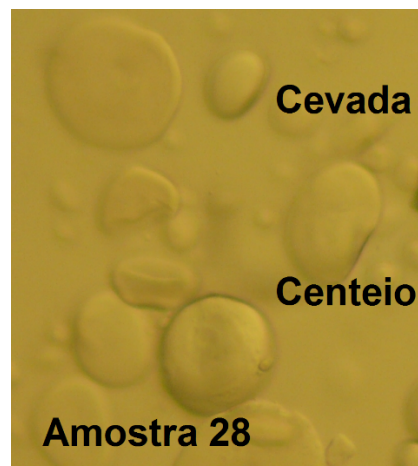


Imagem 28 Amostra 28 (a) aumento 200X com luz polarizada; (b) aumento 400X.



(a)



(b)

Imagem 29 Amostra 29 aumento 200X com luz polarizada.

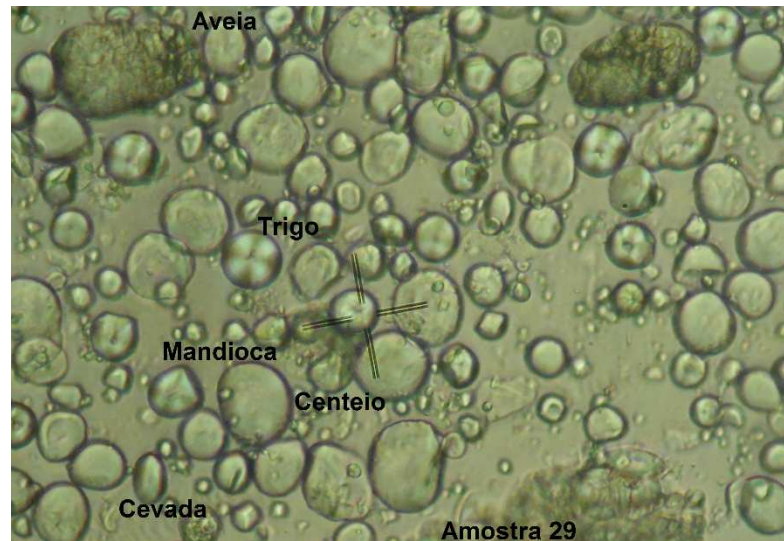


Imagem 30 Amostra 30 aumento 200X com luz polarizada.

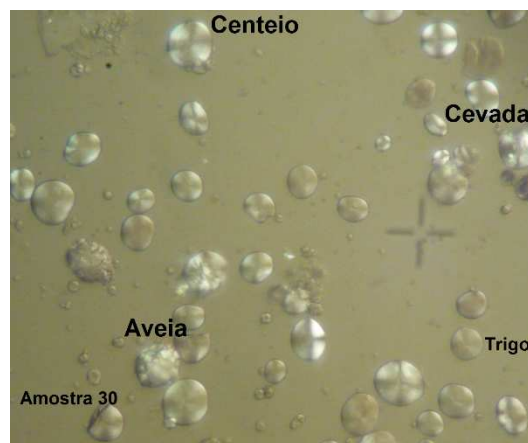
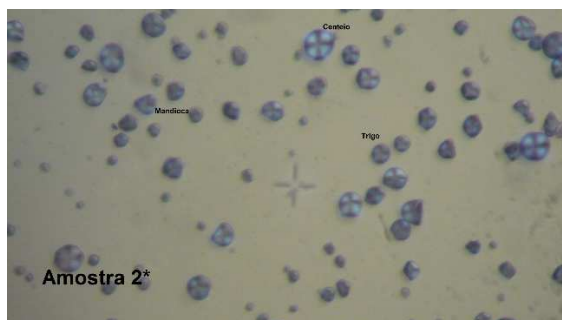


Imagem 31 Amostra 2\* (a) aumento 200X com luz polarizada; (b) aumento 200X.



(a)

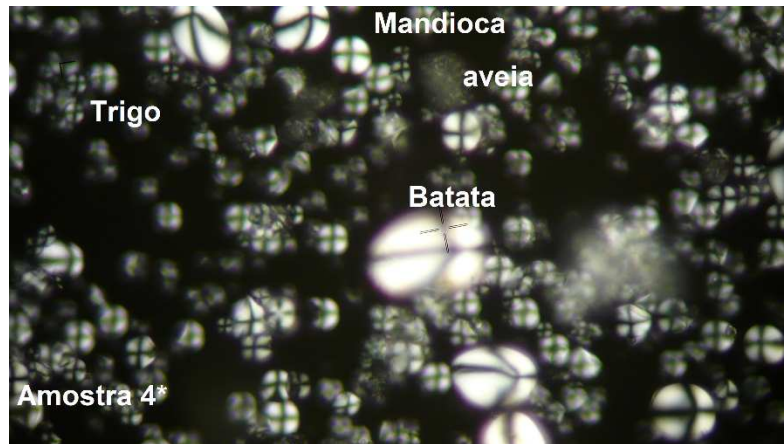


(b)

**Imagem 32 Amostra 3\* aumento 200X com luz polarizada.**



**Imagem 33 Amostra 4\* aumento 400X com luz polarizada.**



**Imagem 34 Amostra 5\* aumento 400X com luz polarizada.**



Imagem 35 Amostra 6\* aumento 200X com luz polarizada.

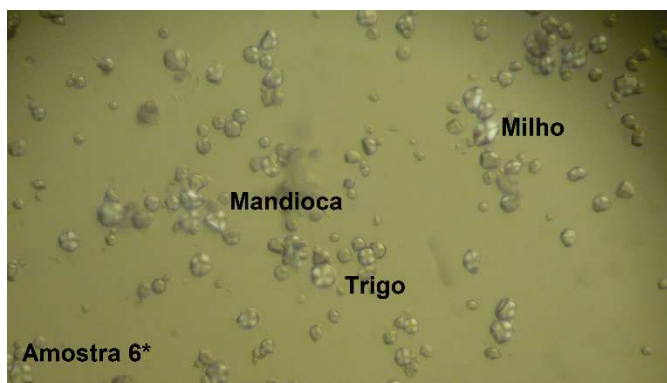


Imagem 36 Amostra 7\* aumento 200X com luz polarizada.

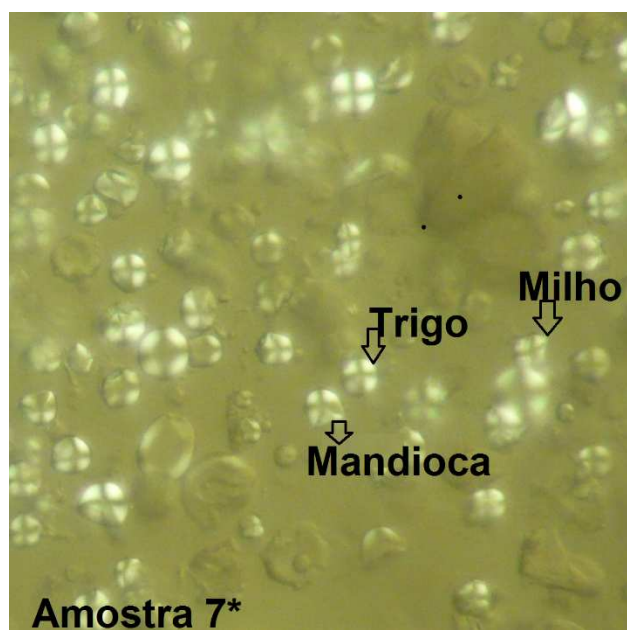
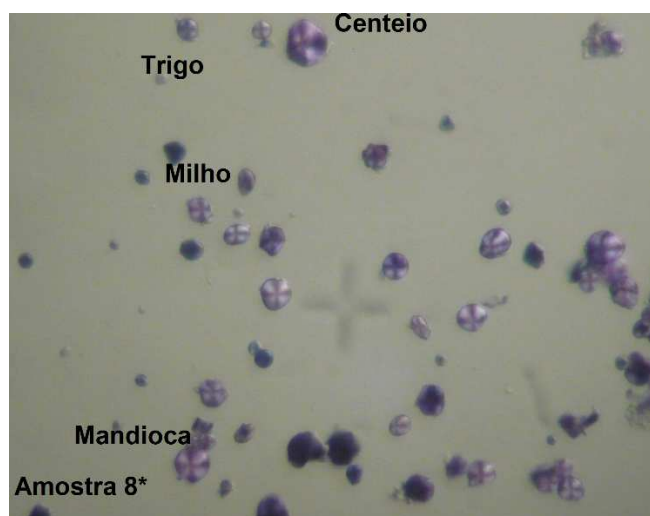
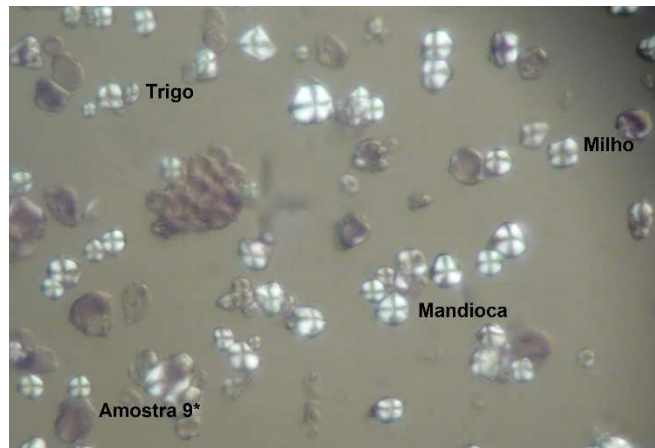


Imagem 37 Amostra 8\* aumento 200X com luz polarizada.

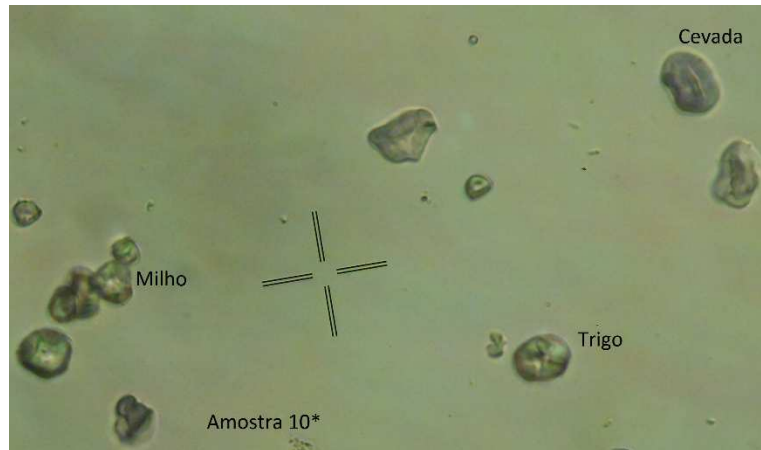




**Imagem 38 Amostra 9\* aumento 200X com luz polarizada.**



**Imagem 39 Amostra 10\* aumento 200X.**



**Imagem 40 Amostra 11\* aumento 200 X .**

