

DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE IMPLEMENTAÇÃO E DESEMPENHO DE ANÁLISE PARA QUANTIFICAÇÃO DE GLÚTEN EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

RENATA K. da CUNHA¹; CRISTIANE R. G. RUFFI²; IZABELA D. ALVIM³; FLÁVIO M. MONTENEGRO⁴; ELIZABETH H. NABESHIMA⁵

Nº 12246

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi atestar a viabilidade de implementação da análise de traços de glúten e sua eficiência no laboratório do Cereal Chocotec/ITAL em produtos isentos de glúten em sua composição, tendo em vista as dificuldades ocasionadas pelo fato de a farinha de trigo “*in natura*”, principal ingrediente utilizado nas atividades de pesquisa, desenvolvimento e análises realizadas por esta Unidade, ser o principal elemento causador de contaminação na análise. Na primeira parte desse projeto, foi feito estudo da infraestrutura da unidade para escolher a sala ideal para a implementação da análise de forma a evitar a contaminação das amostras, além da elaboração dos procedimentos operacionais padrão (POP's) para as etapas de envio e recebimento de amostra. Na segunda parte, foram feitas as análises das amostras com kit comercial através de método ELISA-R5, com limite de detecção de 3 ppm, de acordo com os limites estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*. De acordo com a análise de infraestrutura foi escolhida a sala de análise e feitas as adaptações necessárias para evitar a contaminação cruzada, além da descrição dos procedimentos operacionais padrão. Os resultados obtidos são válidos, pois atendem os requisitos do kit para curva padrão, que apresentou bom coeficiente de correlação. O teor de glúten obtido foi satisfatório, com os valores de <3 ppm para barra de chocolate e pré-mistura para pão de queijo e 78,4 ppm para cereal infantil, próximos dos dados de literatura, demonstrando a eficiência do método e confirmando a viabilidade de implementação desta análise no laboratório do Cereal Chocotec do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).

¹ Bolsista CNPq; Graduação em Eng. de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, renata.rkc@gmail.com

² Colaboradora: Pesquisadora, CEREAL CHOCOTEC/ITAL, Campinas-SP.

³ Colaboradora: Pesquisadora, CEREAL CHOCOTEC/ITAL, Campinas-SP.

⁴ Colaborador: Pesquisador, CEREAL CHOCOTEC/ITAL, Campinas-SP.

⁵ Orientadora: Pesquisadora, CEREAL CHOCOTEC/ITAL, Campinas-SP.

ABSTRACT

The objective of this work was to demonstrate the implementation feasibility of the analysis of gluten traces and its efficiency in the laboratory of Cereal Chocotec/ITAL in gluten-free products, due to the difficulties caused by the fact that in natura wheat flour, the main ingredient used in the activities of research, development and analyses carried out by this unit, is the main cause of contamination in the analysis. In the first part of this project, a study of the unit's infrastructure was made to choose the ideal room for the analysis' implementation, in order to avoid contamination of samples and also the preparation of standard operating procedures to the steps of sending and receiving samples. In the second part, the analyses of the samples were made with a commercial kit by the ELISA-R5 method, with detection limit of 3 ppm, in accordance with the limits established by the *Codex Alimentarius*. According to the analysis of infrastructure the analysis room was chosen and the necessary adjustments to avoid cross-contamination along with the description of standard operating procedures were made. The results obtained were valid, because they attended the requirements for the kit standard curve, which showed good correlation coefficient. The gluten content obtained was satisfactory, with the values of < 3 ppm for chocolate bar and premix for cheese bread, and 78.4 ppm for infant cereal, all close to the literature data, demonstrating the efficiency of the method and confirming the implementation feasibility of this analysis in the laboratory of Cereal Chocotec at the Institute of Food Technology.

INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos contendo glúten, deve ser evitado por uma parcela da população que sofre com a doença celíaca, que consiste em uma doença autoimune, onde há intolerância ao glúten e as proteínas que o formam: a gliadina e a glutenina para o caso do trigo, e as prolaminas de cevada, centeio e aveia (HOWDLE, 2011; PIETZAK; FASANO, 2005). A única forma de controlar os sintomas da doença é eliminar da dieta todos os fatores considerados tóxicos, pois não existe cura. Assim, o tratamento é nutricional e se seguido corretamente leva a uma vida completamente assintomática (PIETZAK, FASANO, 2005; CATASSI; FASANO, 2008; SILVA, 2010).

Os principais alimentos que devem ser excluídos da dieta de um celíaco são, portanto, os alimentos a base de trigo, centeio, cevada e seus derivados, incluindo o cereal tritcale, híbrido de trigo e centeio. A relação do consumo de aveia com os efeitos sintomáticos e histológicos ainda é controversa, o principal problema para seu

consumo é que devido ao contato com outros cereais na colheita, moagem e produção de alimentos, a chance de contaminação cruzada com glúten é muito alta, e acaba impossibilitando um consumo seguro do cereal (PIETZAK; FASANO, 2005; CATASSI; FASANO, 2008; Gluten-free..., 2007; CICLITIRA; ELLIS, 2009).

A dificuldade desta dieta restritiva se deve a ampla utilização de farinha de trigo nos alimentos, que se faz necessária devido a uma característica única do glúten que confere extensibilidade e elasticidade a massa preparada, sendo essencial para obtenção de alguns produtos, tais como, pães, bolos, biscoitos, massas alimentícias, entre outros (POMERANZ, 1987; PIETZAK; FASANO, 2005).

Além disso, muitos produtos industriais utilizam farinha de trigo, proteínas que contém glúten e amido que contém glúten como estabilizantes e espessantes. Esses produtos possuem o chamado “glúten escondido” e incluem salsichas, sopas, molhos e até medicamentos e vitaminas (CATASSI; FASANO, 2008). Dessa forma, a identificação clara da presença de glúten é essencial aos portadores da doença celíaca, pois auxilia na manutenção da dieta (PIETZAK, FASANO, 2005; CATASSI; FASANO, 2008; SILVA, 2010).

O *Codex Alimentarius*, Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação - FAO e da Organização Mundial da Saúde – OMS, estabeleceu para alimentos considerados como não contendo glúten o limite quantitativo de 20 mg/kg de alimento. Além disso, o *Codex* também coloca que fica proibido o uso de glúten ou proteínas do trigo por razões tecnológicas em alimentos que são naturalmente livres de glúten, abrangendo, por exemplo, queijos e chocolates (PIETZAK; FASANO, 2005; SILVA, 2010; HOWDLE, 2011).

No Brasil, a Lei 10.674, de maio de 2003, obriga as indústrias alimentícias a informar nas embalagens de qualquer alimento a presença ou não de glúten através das inscrições “CONTÉM GLÚTEN” ou “NÃO CONTÉM GLÚTEN”, de forma a padronizar a identificação da presença do composto (ANVISA, 2003).

Uma das técnicas mais utilizadas e a indicada pelo *Codex Alimentarius* para a determinação de glúten em produtos alimentícios é a metodologia ELISA-R5 (enzyme-linked immunosorbent assay). O método é baseado no anticorpo monoclonal R5 que reconhece a sequência pentapeptídica tóxica QQPFP (glutamina-glutamina-prolina-fenilalanina-prolina) e que está presente em todas as frações α , β , γ e ω 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; POMS; HEERES; KAMP, 2008; SILVA, 2010).

A utilização de um método de análise normalizado, isto é desenvolvido ou aceito por um órgão de normalização, como é o caso do teste ELISA R-5, gera a necessidade de prova que o laboratório tem capacidade de operar a análise dentro de suas condições específicas de infra-estrutura. Para isso, é necessário realizar a validação do método, processo definido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) como comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos, ou seja, o laboratório deve demonstrar que as análises realizadas levam a resultados confiáveis e que atendem ao esperado (INMETRO, 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

➤ **Análise de infra-estrutura:** a revisão bibliográfica deste projeto levantou diversas dificuldades relacionadas a quantificação de glúten em alimentos devido a contaminação das amostras.

Como o Cereal Chocotec realiza pesquisa e desenvolvimento em produtos derivados do trigo, o local de realização das análises foi criteriosamente selecionado, e para isso, levados em consideração: o tamanho da sala, facilidade de limpeza, capacidade de isolamento, fator de contaminação e a proximidade dos materiais necessários.

➤ **Amostras analisadas:** Barra de chocolate (amostra A), pré-mistura para pão de queijo (amostra B) e cereal infantil (amostra C).

➤ **Análise de glúten por método ELISA R5:** realizada através de kit comercial, a análise foi feita seguindo as instruções do fabricante: a preparação das amostras deve ser feita no mesmo dia do imunoensaio, e o extrato obtido, armazenado no escuro e a temperatura ambiente. A extração depende do tipo de produto a ser analisado, e pode ser feita de duas formas, com solução de etanol (60%) (processo geral), ou com solução “cocktail”. Amostras sólidas devem ser trituradas até a forma de pó e depois tratadas de acordo com o método a que se aplicam. O processo geral de preparação é para amostras sem tratamento térmico ($\leq 90\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a solução “cocktail” é utilizada para amostras que passaram por tratamento térmico ($> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$), ou com presença de soja, cacau, chocolate, café ou taninos, sendo em ambos os casos respeitada a proporção de 1:10.

O kit traz os reagentes em forma de solução concentrada, sendo necessário realizar suas diluições.

A extração com etanol foi feita com 1,0 g de amostra triturada e misturada com 10 ml de etanol (60%), as amostras foram homogeneizadas por 30 segundos em Vórtex, repousaram por 10 minutos e então, foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente em centrífuga, modelo G222TM208, Quimis Ltda. O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo de ensaio de 10 ml.

A extração com solução “cocktail” foi feita com 0,5 g de amostra misturada a 5,0 ml de solução “cocktail”, em seguida as amostras foram homogeneizadas por 10 segundos em Vórtex, e depois, incubadas a 50 °C por 40 minutos em estufa. Os tubos repousaram por 5 minutos para atingir temperatura ambiente. Foram adicionados 15,0 ml de solução de etanol 80% e os tubos foram homogeneizados em Vortex de 10 a 60 segundos, até total dispersão da amostra. Seguiu-se com uma nova incubação por 1 hora a temperatura ambiente, e então, as soluções centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio de 10 ml.

A diluição de amostras é a etapa que segue a extração e depende da quantidade esperada de glúten presente no alimento, e para reduzir o risco de interferência da matriz, a amostra deve ser diluída ao menos 25 vezes.

O procedimento de análise foi então seguido: anexar o número de tiras de análise necessárias de acordo com a quantidade de amostras a serem analisadas e acrescentando poços para os padrões e controles negativos, todos em duplicata. Numerar os poços de acordo com a solução que será acrescentada a cada um. Lavar a placa com tampão de lavagem três vezes antes de iniciar. Pipetar 100 µl das soluções padrão, negativos e extratos das amostras nos poços (duas diluições para cada extrato). Tampar a microplaca e incubar por 60 minutos, a serem contados do preenchimento do último poço. Despejar o conteúdo dos poços com um movimento rápido e enxaguar cada poço com pelo menos 300 µl de solução de lavagem de 5 a 10 segundos, esvaziar a microplaca e bater em papel absorvente várias vezes, este procedimento de lavagem deve ser feito 4 vezes. Adicionar 100 µl de conjugado diluído em cada poço e misturar suavemente com movimentos circulares. Tampar a microplaca e incubar por 60 minutos, a serem contados do preenchimento do último poço. Executar o procedimento de lavagem 5 vezes. Distribuir 100 µl do substrato em cada poço. Tampar a microplaca e incubar por 10 minutos, a serem contados do preenchimento do primeiro poço. Misturar o conteúdo dos poços suavemente através de movimentos circulares. Adicionar 100 µl de solução de parada em cada poço,

seguindo a ordem de adição do substrato, e misturar minuciosamente com movimentos circulares para total conversão de cor, o azul se tornará amarelo. Ler a densidade óptica ($\lambda = 450 \text{ nm}$) imediatamente, usando uma leitora ELISA e com ar como branco.

As extrações foram realizadas em duplicata e as análises na microplaca ELISA foram feitas em triplicata para cada uma das extrações, de forma a possibilitar análises estatísticas dos resultados. Assim, as amostras A e B foram analisadas no Dia 1 e a amostra C, no dia 2.

A quantificação do teor de glúten é feita através da leitura das densidades ópticas (DO), em leitor de ELISA com comprimento de onda de 450 nm, das soluções nos poços da microplaca ELISA.

Amostras com absorbâncias menores que a do menor padrão (1,56 ng/mL) devem ser re-analisadas em uma diluição menor. Se a absorbância da diluição mínima permitida pelo kit (1/25) ainda for menor que a DO do menor padrão, então a amostra deverá ser reportada como < 3 ppm de glúten, ou seja, não detectável.

O teor de glúten da amostra é obtido através da seguinte equação:

$$\text{Teor de glúten} = \frac{G * D * S * 2}{1000}$$

Sendo, G = concentração de gliadina lida da curva padrão

D = fator de diluição do extrato

S = fator de diluição da preparação da amostra, quantidade total de extrato em mL/g de amostra:

- Procedimento geral de extração $\Rightarrow S = 10$
- Procedimento de extração para amostras pré-aquecidas $\Rightarrow S = 40$
- Procedimento de extração para amostras não homogêneas $\Rightarrow S = 10$

Fator 2 = é a estimativa de que 50% da proteína do glúten é gliadina.

Fator 1.000 converte a concentração de ng/mL para ppm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

➤ **Análise da infra-estrutura:** A sala escolhida para implantação do método possui tamanho ideal, e por enquanto, não possui nenhum tipo de adaptação, sendo possível adequá-la as necessidades da análise, mas sua escolha se deve principalmente a possibilidade de limitar o uso da sala apenas para este fim, enquanto as outras salas abrigariam também outras análises. Assim, o local escolhido para a

amostra evita o problema de contaminação cruzada, mas alguns procedimentos operacionais padrão (POP's) deverão ser rigorosamente seguidos para a realização da análise.

➤ **Procedimentos Operacionais Padrão (POP's):** foram elaborados novos POP's para adaptação da atual norma interna para as necessidades da determinação de glúten em produtos alimentícios. As mudanças englobam o envio e recebimento das amostras visando evitar a contaminação das amostras durante a coleta e recebimento da amostra.

➤ **Vidrarias e outros materiais para análise:** todos os materiais utilizados para esta análise deverão ser exclusivos para este fim, sendo inclusive armazenados em compartimento especial e rotulados, para que não haja compartilhamento e contaminação. As vidrarias devem ser lavadas com água e sabão, e depois com solução alcóolica de etanol (70%) ou metanol, sugere-se também tampar a boca das vidrarias antes de guardá-las.

➤ **Escolha dos produtos alimentícios para análise:** os produtos alimentícios escolhidos para análise foram determinados de acordo com os seguintes critérios: interesse para o Cereal Chocotec e citação na literatura para fins de comparação de resultados.

➤ **Teor de glúten nas amostras:** a leitura das densidades ópticas do padrão negativo e das soluções padrão de gliadina européias, fornecidos no kit, apresentou os valores na Tabela 1. Dessa forma, as análises realizadas são válidas, pois a densidade óptica do padrão negativo atende aos requisitos de análise, sendo inferior a 0,25 em ambos os dias.

Tabela 1 – Densidades ópticas medidas para as soluções padrão nos dia 1 e 2

| Padrão (ng/ml) | | Negativo | 1,56 | 3,13 | 6,25 | 12,50 | 25,00 |
|----------------|-------|----------|------|------|------|-------|-------|
| DO (450 nm) | Dia 1 | 0,24 | 0,48 | 0,63 | 0,92 | 1,28 | 1,70 |
| | Dia 2 | 0,24 | 0,43 | 0,68 | 1,00 | 1,59 | 2,10 |

As curvas padrão obtidas com os resultados são apresentadas abaixo, na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, e apresentaram um bom coeficiente de correlação de 0,999 para ambas.

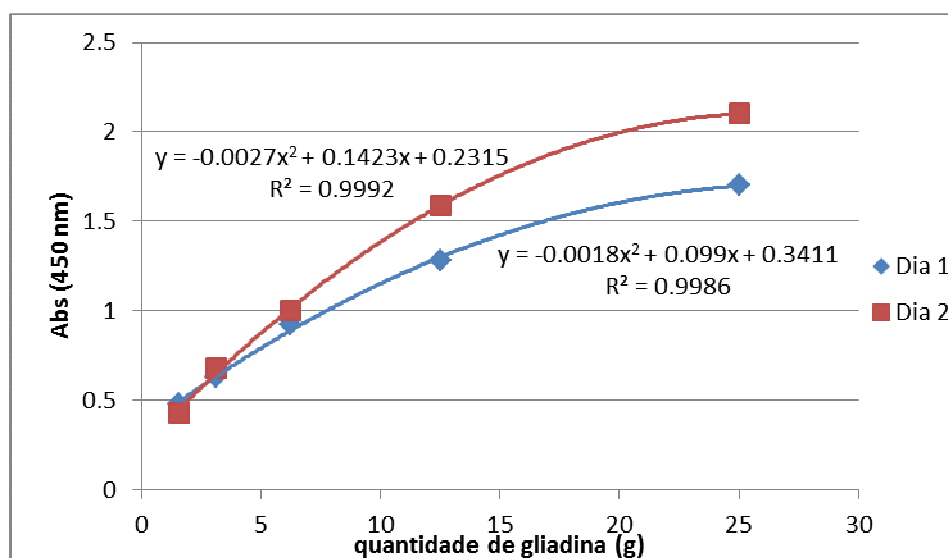


Figura 1 - Curvas padrão de gliadina para os dias 1 e 2

Plotou-se a média das densidades ópticas das amostras diluídas na curva padrão correspondente e leu-se a concentração de gliadina (G) para cada uma, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Média das densidades ópticas para as extrações de cada amostra

| | Dia | Extração | DO | Média da DO | Gliadina (G) |
|----------------|-----|----------|-----------|-------------|---------------|
| Amostra A | 1 | 1 | 0,25±0,04 | 0,27 | Fora da curva |
| Diluição 1:25 | | 2 | 0,29±0,02 | | |
| Amostra B | 1 | 1 | 0,41±0,02 | 0,42 | Fora da curva |
| Diluição 1:25 | | 2 | 0,43±0,11 | | |
| Amostra C | 2 | 1 | 1,13±0,05 | 1,36 | 9,80 |
| Diluição 1:400 | | 2 | 1,58±0,36 | | |

Amostra A: barra de chocolate; Amostra B: pré-mistura para pão de queijo; Amostra C: cereal infantil

Com a leitura de gliadina nas curvas padrão correspondentes, calculou-se os teores de glúten. As amostras A e B apresentaram leitura fora da curva de calibração mesmo na menor diluição possível e por esse motivo o teor de glúten não é detectável. Os resultados do teor de glúten das amostras A, B e C são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Teor de glúten (ppm) para cada amostra

| Amostra | A | B | C |
|----------------------|-----|-----|------|
| Teor de glúten (ppm) | < 3 | < 3 | 78,4 |

Amostra A: barra de chocolate; Amostra B: pré-mistura para pão de queijo; Amostra C: cereal infantil

Os resultados obtidos na determinação de glúten em produtos alimentícios por método ELISA R-5 apresentaram valores praticamente idênticos aos apresentados em literatura (SILVA, 2010), onde as mesmas matrizes foram analisadas através do mesmo método, e a quantificação resultou nos valores de <3 ppm para as amostras A e B, e de 80 ppm para a amostra C.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para os teores de glúten nas amostras avaliadas apresentaram valores condizentes com a literatura, permitindo considerar que o método foi bem sucedido.

Dessa forma, fica estabelecida a viabilidade de implementação da análise de glúten de produtos alimentícios no laboratório de controle de qualidade do Cereal Chocotec/ITAL, através de método ELISA R-5, desde que sejam seguidas as medidas preventivas para evitar contaminação cruzada das amostras.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CEREAL CHOCOTEC - ITAL, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 10.674 - **REGULAMENTO TÉCNICO PARA ROTULAGEM DE ALIMENTOS E BEBIDAS EMBALADOS QUE CONTENHAM GLÚTEN**, de 16 de maio de 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 de maio de 2003. 19-03-2003.
- CATASSI, C.; FASANO, A. Celiac Disease. In: ARENDT, E. K.; BELLO, F. D. (Ed). **Gluten-free Cereal Products and Beverages**. Elsevier Inc, 2008.
- CICLITIRA, P. J.; ELLIS, J. H. Classification of Proteins in Cereal Grains: What is Toxic and How Is It Measured in Foods?. In: GALLAGHER, E. (Ed). **Gluten-Free Food Science and Technology**. Blackwell Publishing Ltd., 2009.
- CODEX Alimentarius. **CODEX STANDARD FOR FOODS FOR SPECIAL DIETARY USE FOR PERSONS INTOLERANT TO GLÚTEN**. CODEX STAN 118 – 1979 (amended 1983, revised 2008). CODEX STAN 188 – 1979, 2008.

DEUTSCH, H.; POMS, R.; HEERES, H.; KAMP, J. W. VAN DER. Labeling and regulatory issues. In: ARENDT, E. K.; BELLO, F. D. (Ed). **Gluten-free Cereal Products and Beverages**. Elsevier Inc, 2008.

Gluten-free labeling of foods. United States, Lanham: **Federal Information & News Dispatch, Inc**; 2007 Jan 23.

HOWDLE, P. D. Celiac Disease. In: BANERJEE, B. (Ed). **Nutritional Management of Digestive Disorders**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2011.

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008**. Revisado em julho de 2011.

NABESHIMA, E. H. **Desenvolvimento de massas alimentícias instantâneas de arroz, pelo processo de extrusão termoplástica, utilizando farinhas quimicamente modificadas**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP, Brasil, 2007.

PIETZAK, M. M.; FASANO, A. Celiac Disease: A New Paradigm of an Immune-Mediated Disorder Due to Dietary Gluten. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. (Eds). **Reviews in Food and Nutrition Toxicity**, Volume 3. Boca Raton: CRC Press LLC, 2005.

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

SILVA, R. P. **Detecção e quantificação de glúten em alimentos industrializados por técnica ELISA**. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 2010. p 13 – 66.

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, Volume 108, Issue 10. October 2008. p. 1682 – 1687.