

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia

Cristiane Lúcia Goddard

**GLÚTEN: OCORRÊNCIA EM ALIMENTOS INDUSTRIALIZADOS E
MONITORAMENTO DA APLICAÇÃO DA LEI 10.674 DE 2003**

Belo Horizonte
2016

Cristiane Lúcia Goddard

**GLÚTEN: OCORRÊNCIA EM ALIMENTOS INDUSTRIALIZADOS E
MONITORAMENTO DA APLICAÇÃO DA LEI 10.674 DE 2003**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira

Belo Horizonte

2016

G578g Goddard, Cristiane Lúcia.
Glúten [recurso eletrônico]: ocorrência em alimentos industrializados e monitoramento da aplicação da Lei 10.674 de 2003 / Cristiane Lúcia Goddard. – 2016.
1 recurso eletrônico (104 f. : il.) : pdf.

Orientador: Roberto Gonçalves Junqueira.
Coorientadora: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Doença celíaca – Teses. 2. Gliadina – Teses. 3. Imunoensaio – Teses. 4. Vigilância Sanitária – Teses. 5. Rotulagem de alimentos – Teses. I. Junqueira, Roberto Gonçalves. II. Ferreira, Scheilla Vitorino Carvalho de Souza. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 664.0026

Elaborado por Aline Guimarães Amorim – CRB-6/2292

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

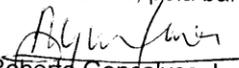
FOLHA DE APROVAÇÃO

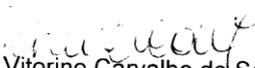
GLÚTEN: OCORRÊNCIA EM ALIMENTOS INDUSTRIALIZADOS E MONITORAMENTO DA APLICAÇÃO DA LEI 10.674 DE 2003

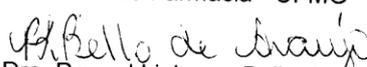
CRISTIANE LUCIA GODDARD

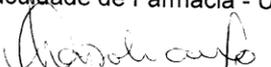
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

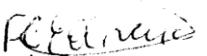
Aprovada em 14 de dezembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira (Orientador)
Faculdade de Farmácia - UFMG


Profa. Dra. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira
Faculdade de Farmácia - UFMG


Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo
Faculdade de Farmácia - UFMG


Profa. Dra. Michely Capobiango
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC-MG


Profa. Dra. Fernanda Cristina Esteves de Oliveira
Universidade Federal de São João Del-Rei - UFSJ

Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2016.

Á Deus pelo dom da vida,

Aos meus pais pelo incentivo, apoio e
amor, sempre,

Aos meus irmãos Lilian, Leila e Ralph, e
aos meus cunhados Marcelino e Thiago
por me impulsionarem a seguir em frente,

Ao Pedro, afilhado querido, por trazer
tanto amor a todos nós,

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Ao Serviço de Química do Instituto Octávio Magalhães (IOM) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pesquisadora Tânia Amâncio Guerra Peixoto pela oportunidade de realização deste trabalho, em especial aos meus colegas de trabalho que, além disto, são amigos.

À R-Biopharm, Juliana Ramos Dzik, pela disponibilidade, treinamento na operação do kit e pelo fornecimento da documentação solicitada.

Ao Serviço de Análise de Produtos para Saúde do IOM da FUNED, Pesquisadora Adriane Zacarias Nunes e toda sua equipe pela colaboração, treinamento, e empréstimo de equipamentos além da amizade.

Ao Laboratório de Rotulagem do IOM da FUNED, Pesquisadora Simone Gonçalves pela colaboração.

Ao Serviço de Imunologia Aplicada da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento (DPD) da FUNED, Pesquisador Luiz Guilherme Dias Heneine, pela colaboração e empréstimo de equipamentos.

À Fundação de amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Biblioteca da FAFAR, Secretaria do Departamento de Alimentos da FAFAR/UFMG e Secretaria do PPGCA pela assistência nas pesquisas bibliográficas e resolução de questões administrativas.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Deus e a minha família guerreira, pai e mãe pelo apoio incondicional, ao meu afilhado Pedro, pelos momentos de alegria na convivência, à Maria Isabel (Bebel, meu pet) por alegrar todos os meus dias.

Ao Prof. Roberto Gonçalves Junqueira, pelo incentivo, confiança e apoio na orientação deste trabalho e pelas valiosas contribuições.

À Prof.^a Scheilla Vitorino Carvalho de Souza, pela confiança e apoio na coorientação deste trabalho e pelos ensinamentos partilhados.

Aos professores do PPCGA da FAFAR/UFMG, por estimularem meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

À Tânia pelo incentivo e por proporcionar a realização deste trabalho.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Química Bromatológica, Flávio, Gizele, Liliane, Alysson, Priscila e Adriana, às minhas estagiárias Danielle, Jéssica, Stéfani e Cristiane, em especial às amigas Cláudia e Sara por me incentivarem na realização desta etapa e por me incentivarem a não desistir dos meus planos. Vocês alegram os meus dias!

Aos meus amigos e parentes que, de coração, torceram pela superação de mais uma importante etapa com carinho e palavras de incentivo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!!!

*“Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor.
Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também
se aprende.*

*Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre
rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no
caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”*

Cora Coralina

RESUMO

A fim de avaliar a concordância do resultado analítico com as declarações de rotulagem em alimentos industrializados e verificar a aplicação da Lei 10.674 de 2003 que obriga que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca, foram determinados os teores de glúten em 245 produtos, de 15 categorias, prioritariamente com declaração “Não contém glúten”, entre março de 2015 e setembro de 2016. O desempenho do método imunoenzimático normalizado da *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC foi avaliado em função da veracidade, limite de quantificação, repetibilidade e precisão intermediária. A incerteza de medição do método foi estimada pela soma das contribuições individuais das fontes. Os resultados analíticos foram confrontados com a declaração da presença ou ausência do glúten no rótulo e com a lista de ingredientes presentes nos rótulos dos produtos. A inclusão de frases de advertência e a utilização de outras expressões não previstas na atual legislação também foram observadas. Foi verificado que 235 amostras (95,9%) apresentaram teores de glúten inferiores ao limite de detecção de 5 mg/kg. Pôde-se perceber o descumprimento da Lei 10.674/2003 em 54 amostras (22,0%) nos seguintes casos: em cinco amostras de farinha de milho e fubá não havia a declaração da presença ou ausência de glúten; em 26 amostras de biscoito de polvilho, biscoito sem glúten, macarrão sem glúten e tapioca identificou-se o uso de expressões não previstas na Lei tais como “Sem glúten”, “Zero glúten” e “Apto para celíacos”; em 21 amostras, a declaração “Contém glúten” era apresentada, mesmo sem conter ingrediente fonte e em desacordo com o teor analítico de glúten, e em duas amostras de temperos prontos, de diferentes marcas, havia a declaração “Não contém glúten”, mas estas apresentaram teores de glúten de 16 e 37 mg/kg, caracterizando risco para o consumidor celíaco. Concluiu-se que o método proposto foi adequado ao propósito de quantificação de glúten, que mais de 99% dos alimentos que declaram “Não contém glúten” foram seguros para o consumo por celíacos, que os fabricantes devem se adequar ao que determina a Lei 10.674/2003 e que é necessária a continuidade do monitoramento com a inclusão de outras categorias alimentares para garantir a segurança do consumidor celíaco.

Palavras-chave: Doença celíaca; gliadina, imunoensaio; Vigilância Sanitária; incerteza de medição.

ABSTRACT

In order to evaluate the agreement of the analytical result with the labeling statements on processed foods and verify the application of Law 10,674 of 2003, which requires that food products sold inform about the presence of gluten, as a preventive and control measure for celiac disease, gluten content was determined in 245 products, from 15 categories, primarily with the declaration "Does not contain gluten", between March 2015 and September 2016. The performance of the standardized immunoenzymatic method of the Association of Official Analytical Chemists – AOAC was evaluated based on veracity, limit of quantification, repeatability and intermediate precision. The measurement uncertainty of the method was estimated by summing the individual contributions of the sources. The analytical results were compared with the declaration of the presence or absence of gluten on the label and with the list of ingredients present on the product labels. The inclusion of warning phrases and the use of other expressions not provided for in current legislation were also observed. It was found that 235 samples (95.9%) had gluten levels below the detection limit of 5 mg/kg. Non-compliance with Law 10,674/2003 could be seen in 54 samples (22.0%) in the following cases: in five samples of corn flour and cornmeal there was no declaration of the presence or absence of gluten; in 26 samples of tapioca starch biscuits, gluten-free biscuits, gluten-free pasta and tapioca, the use of expressions not provided for in the Law was identified, such as "Gluten-free", "Gluten-free" and "Suitable for celiac patients"; in 21 samples, the declaration "Contains gluten" was presented, even without containing a source ingredient and in disagreement with the analytical gluten content, and in two samples of ready-made seasonings, from different brands, there was the declaration "Does not contain gluten", but these presented gluten levels of 16 and 37 mg/kg, representing a risk for celiac consumers. It was concluded that the proposed method was suitable for the purpose of quantifying gluten, that more than 99% of foods that declare "Does not contain gluten" were safe for consumption by celiac patients, and that manufacturers must adapt to the provisions of Law 10,674 /2003 and that continued monitoring is necessary with the inclusion of other food categories to guarantee the safety of celiac consumers.

Key words: Celiac disease; gliadin, immunoassay; Health Surveillance; measurement uncertainty

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – O grão de trigo e sua composição.....	21
Figura 2 – O glúten (a) e suas frações (b).....	22
Figura 3 – Classificações propostas de reações adversas ao glúten.....	26
Figura 4 – Princípio do método de ELISA	49
Figura 5 – Número de amostras analisadas para cada grupo de alimentos	57
Figura 6 – Ficha de avaliação: resultados positivos, negativos e inválidos.....	60
Figura 7 – Fluxograma de preparo e extração da amostra	62
Figura 8 – Apresentação da placa de ELISA.....	64
Figura 9 – Fluxograma do imunoensaio	65
Figura 10 – Perfil da curva de calibração	66
Figura 11 – Delineamento experimental para verificação de desempenho do método	68
Figura 12 – Contribuição (%) de cada fonte de incerteza	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação geral dos diferentes grupos de proteínas do trigo.	23
Tabela 2 – Limites de glúten estabelecidos por cada órgão para declaração de rotulagem.	32
Tabela 3 - Estudos de determinação de glúten em alimentos, realizados no Brasil de 2001 a 2014.	38
Tabela 4 - Estudos internacionais de determinação de glúten entre 1993 e 2015.	42
Tabela 5 - Categorização de alimentos por órgão de referência.....	46
Tabela 6 - Alimentos analisados quanto ao teor de glúten segundo categorização da ANVISA.	56
Tabela 7 - Volumes de conjugado enzima-anticorpo e água ultrapura utilizados para diluição do conjugado enzima-anticorpo em função do número de poços utilizados. .	58
Tabela 8 – Comparação dos teores de glúten dos MR declarados pelo fabricante e obtidos experimentalmente.	71
Tabela 9 – Desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária e HorRat obtidos por imunoensaio.	72
Tabela 10 – Total de amostras e marcas por categorias de alimentos com suas respectivas declarações do rótulo e enquadramento do teor de glúten.	76
Tabela 11 – Número de amostras analisadas por categoria, declaração do rótulo, presença de ingrediente fonte de glúten e teor analítico de glúten.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de normas técnicas
ABS	Absorbância
ACELBRA	Associação dos celíacos do Brasil
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
CDC	Código de defesa do consumidor
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD	Concentração média determinada
CV	Coefficiente de variação
Da	Dalton
DC	Doença celíaca
DIVISA	Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DPD	Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento
DPR _r	Desvio padrão relativo da repetibilidade
DPR _R	Desvio padrão relativo da reprodutibilidade
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
g	gramas
<i>g</i>	Força gravitacional
HMW	Elevada Massa Molar
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IOM	Instituto Octávio Magalhães
IRMM	Instituto de Materiais e Medições de Referência

ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LACEM-MG	Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais
LD	Limite de detecção
LMW	Baixa massa molar
LQ	Limite de quantificação
LQB	Laboratório de Química Bromatológica
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	miligramas
min.	minutos
MR	Material de referência
MRC	Material de referência certificado
MS	Espectrometria de massas
ND	Não Detectado
nm	Nanômetro
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PPGCA	Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos
PROGVISA	Programa de Monitoramento da Qualidade de Alimentos do estado de Minas Gerais
QQFPF	Glutamina-Glutaina-Prolina-Fenilalanina-Prolina
RBC	Rede Brasileira de Calibração
SG	Sem Glúten
SGNC	Sensibilidade ao Glúten Não Celíaca
SIFG	Sem Ingrediente Fonte de Glúten
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
TT	Tratamento Térmico
UE	União Europeia
UHT	Ultra High Temperature
VIM	Vocabulário internacional de metrologia
VISA	Vigilância Sanitária
WB	Western Blot

SUMÁRIO

SUMÁRIO	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Cereais: características gerais, consumo e proteínas relacionadas ao glúten	20
3.2 Desordens relacionadas ao glúten	26
3.3 A doença celíaca	27
3.4 Legislação no Brasil e no exterior.....	31
3.5 A fiscalização de alimentos no âmbito da Vigilância Sanitária	34
3.6 A importância da rotulagem de alimentos no controle da DC.....	36
3.7 Determinação de glúten em alimentos	37
3.8 Métodos de detecção e quantificação do glúten	47
3.9 Avaliação de desempenho e incerteza de medição	50
3.9.1 Parâmetros para verificação de desempenho do método quantitativo.....	51
3.9.2 Incerteza de medição.....	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Amostragem	55
4.2 Soluções	57
4.3 Descontaminação e preparo do ambiente, embalagens e materiais.....	59
4.4 Determinação do teor de glúten pela quantificação da gliadina	60
4.4.1 Preparo e extração da amostra	61
4.4.2 Preparo do material de referência	63
4.4.3 Preparo da curva de calibração	63
4.4.4 Realização do imunoensaio.....	63
4.4.5 Critério de aceitação da curva.....	66
4.5 Cálculos	67
4.6 Verificação de desempenho do método	67
4.7 Estimativa da incerteza de medição.....	69
4.8 Avaliação da rotulagem.....	69

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 Descontaminação do ambiente, embalagens e materiais	70
5.2 Avaliação de desempenho do método.....	70
5.3 Estimativa da incerteza de medição.....	73
5.4 Monitoramento de alimentos processados quanto a presença ou não de glúten	75
5.4.1 Alimentos tradicionalmente sem glúten	78
5.4.2 Alimentos modificados para celíacos	80
5.4.3 Rotulagem.....	81
6. CONCLUSÕES	84
7. PERSPECTIVAS/ CONSIDERAÇÕES/ SUGESTÕES	85
8. PUBLICAÇÕES	86
9. APÊNDICES	99

1. INTRODUÇÃO

A família *Gramineae* (*Poaceae*) representa a quarta maior família das angiospermas abrangendo as mais importantes plantas para a produção de alimentos para a humanidade (PETERSON, 2005). Destacam-se, nesta família, o trigo, a cevada, a aveia e o centeio, que são vegetais cujas estruturas dos grãos apresentam uma mistura de proteínas que resulta no glúten (MAPA, 2012).

O glúten é uma mistura complexa de proteínas, com mais de 50 diferentes componentes presente. Estes podem ser divididos em subgrupos com base em suas estruturas e propriedades; as gliadinas são divididas em tipos α -, γ - e ω com base em suas seqüências de aminoácidos e mobilidade em eletroforese a pH baixo, e as subunidades de glutenina reduzidas são divididas em grupos de alto peso molecular e de baixo peso molecular (TATHAM et al., 2000).

As desordens relacionadas ao trigo englobam reações alérgicas, intolerância ou sensibilidade ao trigo ou glúten e a doença celíaca (DC) (SAPONE et al., 2012).

A DC consiste em uma enteropatia autoimune causada por sensibilidade permanente ao glúten em indivíduos geneticamente susceptíveis. Causa inflamação gastrointestinal crônica por resposta imune exacerbada à ingestão do glúten resultando em atrofia das microvilosidades e consequente má absorção e é tratada por adoção de dieta com restrição ou até mesmo exclusão do glúten por toda a vida (GREEN; CELLIER, 2007). Esta patologia, por sua vez teve seus estudos iniciados na Europa onde foi reportada uma prevalências variando em torno de 1:130 a 1:300 habitante. No Brasil, embora dados estatísticos oficiais sejam desconhecidos, há uma estimativa de que a prevalência seja semelhante à descrita para os países europeus e dos Estados Unidos, tornando a DC um problema de saúde pública do ponto de vista epidemiológico visto sua apresentação clássica ou em formas atípicas com consequente baixa estatura, anemia, doenças neurológicas, psiquiátricas, infertilidade etc. (ALENCAR et al., 2012; ARAÚJO et al., 2010).

Visto que o tratamento da DC consiste em, ao longo da vida, se fazer uma dieta isenta de glúten, excluindo-se também medicamentos que o contenham, e que a transgressão à dieta pode ocorrer de forma involuntária, devido à contaminação cruzada ou pela não especificação da presença do glúten nos rótulos de alimentos, as informações dos rótulos constituem importantes ferramentas para o sucesso do

tratamento, devendo ser fidedignas, legíveis e acessíveis a todos os consumidores (GREEN *et al.*, 2001; FERREIRA; LANFER-MARQUEZ, 2007).

A obrigatoriedade da declaração da presença ou ausência do glúten nos rótulos de alimentos industrializados é prevista no Brasil desde 2003, pela Lei 10.674 da Presidência da República (BRASIL, 2003). No entanto, essa regulamentação não estabelece um valor a partir do qual o alimento deve ser rotulado “Contém glúten”. Diferentemente, as legislações adotadas pelo mundo, que no geral se baseiam no Codex Alimentarius, determinam o valor máximo de 20 mg/kg como critério de uso do termo “Gluten-free” (Codex Alimentarius, 2015; EC, 2002; FDA, 2014).

Informações sobre a avaliação do glúten em alimentos comercializados no Brasil são escassas. Apenas 11 estudos foram realizados entre 2001 e 2014, sendo estes limitados a estados do Sul e Sudeste além do Distrito Federal. Vale destacar que nenhum estudo foi conduzido em Minas Gerais (ABREU *et al.*, 2006; LAUREANO, 2010; MORAIS *et al.*, 2014).

Internacionalmente, o glúten vem sendo analisado em diversos alimentos, por diferentes metodologias, muito antes de ser estudado no Brasil. Alimentos com declaração “Não contém glúten” avaliados em 1993 apresentavam percentual de insatisfatoriedade de aproximadamente 80% (ALLMANN *et al.*, 1993) e dados recentes demonstram uma evolução no controle dos produtos com redução deste percentual para cerca de 5% (THOMPSON; SIMPSON, 2015).

Neste contexto, considerando a importância da rotulagem como uma das formas de controle da doença celíaca, os relatos de contaminação cruzada em diversos tipos de alimentos utilizados por celíacos ou diretamente destinados a esta população, e a escassez de estudos brasileiros sobre o tema, o presente trabalho foi fundamentado na importância do monitoramento dos teores de glúten em alimentos industrializados comercializados em Minas Gerais para verificação da adequação da rotulagem à Lei 10.674/2003. Esta verificação deu-se por meio da quantificação de glúten realizada por testes de imunoadsorção enzimática (ELISA) e comparação dos resultados com as declarações de rotulagem, a fim de fornecer informações para órgãos fiscalizadores, como a Vigilância Sanitária, contribuindo para elaboração de possíveis medidas relacionadas às políticas de segurança alimentar e Saúde Pública.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o teor de glúten em alimentos industrializados de diferentes categorias, prioritariamente declarados como “Não contém glúten”, e avaliar a concordância do resultado analítico com as declarações de rotulagem e com a Lei 10.674/2003.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o teor de glúten nos alimentos naturalmente sem glúten: sucos de fruta e bebidas à base de soja, biscoitos de polvilho, café, cárneos (hambúrgueres, salsichas e mortadela), produtos de milho (farinha, fubá e salgadinho), pão de queijo, preparados em pó a base de arroz, batata e milho e tapioca; nos alimentos especialmente processados para reduzir o teor de glúten: macarrões e biscoitos, e nos alimentos que podem conter ou não ingredientes que possuem glúten ou propensos à contaminação cruzada: bebida láctea sabor chocolate e tempero em pó;
- Verificar o desempenho do método imunoenzimático normalizado RIDASCREEN® Gliadin (R7001) a partir dos parâmetros: limite de quantificação, precisão sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, veracidade e estimativa da incerteza de medição;
- Correlacionar o resultado analítico com a declaração “contém glúten” / “não contém glúten” e a lista de ingredientes presentes no rótulo do produto;
- Avaliar criticamente os resultados analíticos e de rotulagem a fim de subsidiar ações de vigilância sanitária e implementação de políticas de Saúde Pública mais adequadas ao consumidor celíaco.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cereais: características gerais, consumo e proteínas relacionadas ao glúten

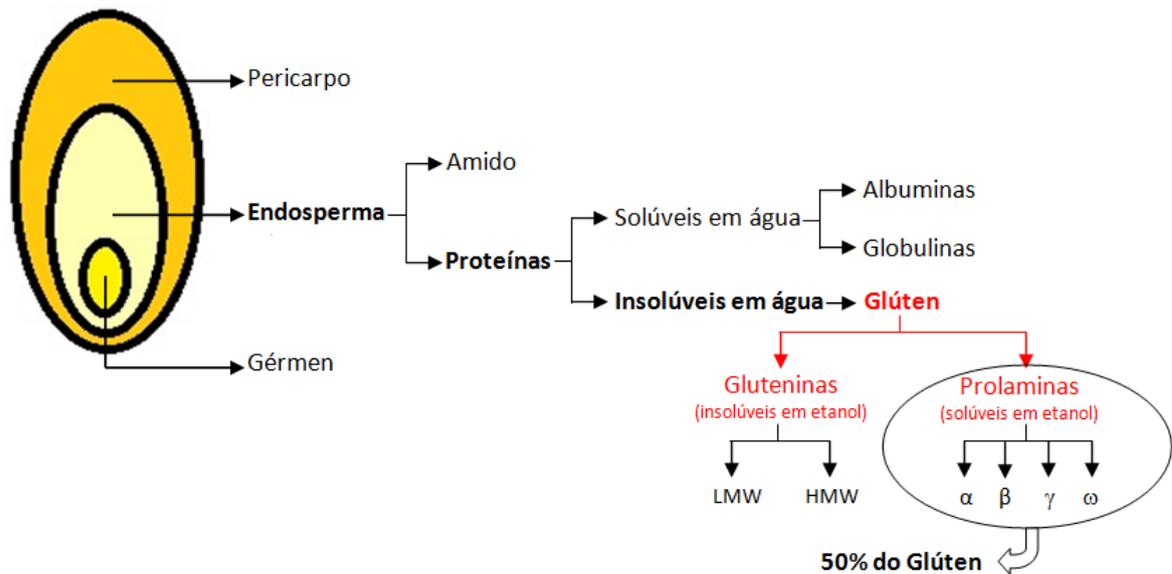
Pertencente à família *Gramineae*, a qual também pertencem a cevada, a aveia e o centeio, o trigo se destaca por ser o ingrediente de uma grande variedade de produtos consumidos frequentemente, como pães, bolos, biscoitos, doces com farinha, pizzas, macarrões, dentre outros (RODRÍGUES de MIRANDA; GONZÁLES; PÉREZ, 1998).

O trigo está entre as plantas mais cultivadas no mundo e ocupa o segundo lugar em produção de grãos, com significativo impacto na economia agrícola global. Existem cerca de 30 tipos de trigo, geneticamente diferenciados, dos quais metade é cultivada. No Brasil, este cultivo ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (MAPA, 2012).

Segundo dados do Conselho Internacional de Grãos (IGC), foi estimada, no ano de 2015, uma produção de trigo, cevada, aveia e centeio de cerca de 35,6%, 7,1%, 1,1% e 0,7%, respectivamente, do total de grãos coletados para a safra de 2016/2017 (IGC, 2015).

Proteínas de glúten são encontradas no endosperma do grão de trigo maduro, onde formam uma matriz contínua em torno dos grânulos de amido. As proteínas do glúten são, em grande parte, insolúveis em água ou em solução salina diluída. Dois grupos funcionalmente distintos de proteínas de glúten podem ser citados: gliadinas monoméricas e gluteninas poliméricas (extraível e não extraível). Gliadinas e gluteninas são normalmente encontradas em quantidades similares no trigo (**Figura 1**) (GOESAERT *et al.*, 2005).

Figura 1 – O grão de trigo e sua composição

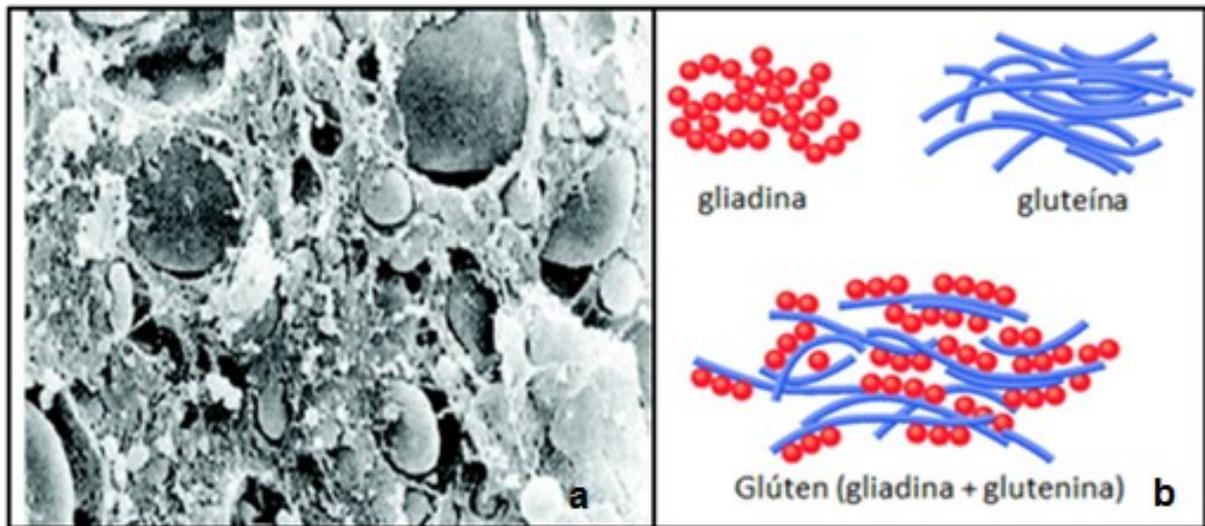


Legenda: LMW: baixa massa molar; HMW: elevada massa molar; α , β , γ e ω : subclassificações das prolaminas do trigo (ou gliadina).
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

As proteínas associadas a doença celíaca (DC) e outras condições relacionadas ao glúten são definidas como prolaminas. Estas são frações alergênicas da proteína solúvel em etanol, que fazem parte da composição do glúten. Cada um dos cereais tem uma prolamina específica, dentre as prejudiciais para pacientes com DC temos: gliadina no trigo, hordeína na cevada, avenina na aveia e secalina no centeio (CICLITIRA; ELLIS, 1991).

As prolaminas são solúveis em misturas álcool-água, tais como, solução aquosa de 1-propanol 50% (v/v) ou solução aquosa de etanol 60-70% (v/v). No entanto, em grãos de trigo e na farinha de trigo, cerca de metade destas subunidades estão presentes em polímeros que não são solúveis em misturas álcool-água, a menos que as ligações dissulfeto entre as subunidades componentes sejam reduzidas usando um agente, tal como 2-mercaptoetanol (2-ME). Os polímeros álcool insolúveis são tradicionalmente chamados gluteninas e os monômeros solúveis em álcool relacionados são chamados gliadinas; os dois grupos de proteínas em conjunto formam a maior parte da fração de glúten (Figura 2) (TATHAM et al., 2000).

Figura 2 – O glúten (a) e suas frações (b)



Fonte: FASANO, 2011.

As gliadinas são constituídas por quatro grupos: α -gliadina, β -gliadina, γ -gliadina e ω -gliadina. Elas apresentam estrutura secundária e a maioria das ligações encontradas são pontes dissulfeto intramoleculares. As gluteninas são polipeptídeos heterogêneos com um peso molecular que varia entre 12.000 e 130.000 Da, estão unidas entre si por pontes dissulfeto intermoleculares e conferem ao glúten alta elasticidade, porém, baixa extensibilidade devido à sua capacidade para polimerizar extensivamente através de reações de permuta de sulfidril-dissulfeto (FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010).

A classificação do glúten baseado em solubilidade foi introduzida por Osborne em 1924 e foi baseada na solubilidade de proteínas vegetais utilizando extração sequencial da seguinte série de solventes: (1) água, (2) solução salina diluída, (3) álcool hidratado e (4) ácido diluído ou álcali. Usando este esquema de classificação Osborne, as proteínas de trigo foram classificadas em albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas, respectivamente (Tabela 1). No entanto, uma fração significativa de proteínas de trigo foi excluída das frações Osborne, porque não eram extraíveis em todos os solventes acima mencionados (GOESAERT et al., 2005).

Tabela 1 – Classificação geral dos diferentes grupos de proteínas do trigo.

Fração Osborne	Comportamento da solubilidade	Composição proteica	Papel biológico	Papel funcional
Albumina	Água	Não-glúten (principalmente monoméricas)	Metabólico e estrutural	Variável
Globulina	Solução salina	Não-glúten (principalmente monoméricas)	Metabólico e estrutural	Variável
Gliadina	Álcoois hidratados	Glúten (principalmente gliadinas monoméricas e polímeros de gluteninas de baixo peso molecular)	Armazenamento (prolamina)	Viscosidade/plasticidade da massa
Glutenina	Ácido acético diluído	Glúten (principalmente polímeros de gluteninas de alto peso molecular)	Armazenamento (prolamina)	Elasticidade/força da massa
Resíduos	Insolúvel	Glúten (polímeros de elevado peso molecular) e polímeros de proteínas não-glúten (triticina)	Armazenamento (prolamina /glúten; globulinas/triticina)	Variável

Fonte: GOESAERT *et al.*, 2005 (adaptado).

Quanto à funcionalidade, as proteínas do trigo podem ser divididas em dois grupos distintos: proteínas não-glúten e proteínas do glúten. As proteínas não-glúten correspondem entre 15 e 20% do total de proteínas de trigo e ocorrem, principalmente, nas camadas exteriores do grão de trigo com concentrações mais baixas no endosperma. A maioria das proteínas não-glúten são extraídas em soluções salinas diluídas e são, por conseguinte, encontradas nas frações segundo classificação de Osborne (albumina e globulina). As proteínas de glúten correspondem a 80 a 85% do total de proteína de trigo e são as principais proteínas de armazenamento do trigo. Elas pertencem à classe de prolaminas de proteínas de armazenamento da semente (SHEWRY; HALFORD, 2002; SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995).

Os nomes gliadina e glutenina são utilizados principalmente para indicar as proteínas funcionalmente/bioquimicamente relacionadas ao invés das frações Osborne exclusivamente solúveis. No entanto, o fracionamento Osborne ainda é amplamente utilizado em estudos sobre a composição proteica relacionada à funcionalidade na panificação. Além disso, devido à sua relativa simplicidade, este método de fracionamento é frequentemente útil como um passo inicial de separação para obter as frações de proteína semi puras (GOESAERT *et al.*, 2005).

O glúten pode ser introduzido não intencionalmente em alimentos devido ao contato cruzado entre grãos isentos de glúten com trigo, centeio e/ou cevada durante a colheita, o transporte ou armazenamento. O contato cruzado durante a fabricação de alimentos, quando se utiliza equipamento comum, também pode resultar na presença de glúten em alimentos fabricados a partir de ingredientes isentos de glúten. A presença acidental de glúten nos alimentos pode ser segura para a maioria dos consumidores, mas pode resultar em reações graves em indivíduos sensíveis a esta proteína (SHARMA; PEREIRA; WILLIAMS, 2015). Existem, ainda, formas mascaradas de fontes de glúten da dieta em produtos industrializados: espessantes, veículos para temperos, sopas espessadas com farinha, catchup, chocolates, malte contido em bebidas achocolatadas, cervejas e o extrato de malte contido em alguns cereais em flocos (RODRÍGUES de MIRANDA; GONZÁLES; PÉREZ, 1998).

O glúten tem sido amplamente estudado pelo seu importante papel na DC, ficando demonstradas as reações adversas em indivíduos sensíveis a gliadina, a hordeína e a secalina nesta doença (RUBIO-TAPIA *et al.*, 2013). Porém, quanto à sensibilidade a avenina ainda existem controvérsias e não há consenso sobre o papel de aveia em uma dieta isenta de glúten (RICHMAN, 2012; THOMPSON, 1997).

De acordo com Butt *et al.* (2008) na aveia as prolaminas representam de 10 a 15% das proteínas totais e são estruturalmente diferentes das prolaminas do subgrupo triticales que engloba trigo, centeio e cevada, que de forma oposta podem ser tão altas como 30 a 50%. Essa diferença que pode explicar por que alguns celíacos toleram maiores quantidades de aveia do que de trigo (THOMPSON, 1997).

Segundo Hernando *et al.* (2008) e Koerner *et al.* (2011) a aveia pode ser facilmente incorporada na dieta como uma boa fonte de nutrientes e fibras. No entanto, a inclusão de aveia na dieta isenta de glúten de pessoas (adultos e crianças) com DC permaneceu controversa principalmente devido a uma longa história de contaminação cruzada de muitos produtos de aveia através das práticas agrícolas com fontes de glúten, notadamente cevada e trigo.

De acordo com Janatuinen *et al.* (1995), em estudos de alimentação de longo prazo, quantidades moderadas de aveia (cerca de 50 g de consumo por dia durante 6 a 12 meses) não desencadearam qualquer efeito sobre a mucosa intestinal de pacientes com DC, sendo segura para a maioria dos pacientes. Mas considerando relatos de que alguns indivíduos com DC podem não tolerar aveia não contaminada, a publicação de 2009 da Health Canada recomendou que as quantidades de aveia não contaminada consumidas por indivíduos com DC devem ser limitadas a 20-25 g/dia para crianças e 50-70 g/dia para adultos.

Em seus estudos La Vieille *et al.* (2016) concluíram que a adição de aveia não contaminada às dietas livres de glúten foi aceita e tolerada pela maioria dos pacientes de CD, como indicado pela normalização da arquitetura da mucosa do intestino delgado e marcadores de sorologia celíacos. Porém, alguns celíacos parecem ser clinicamente intolerantes à aveia, sendo que está só deve ser introduzida à dieta depois que todos os sintomas da DC tenham sido controlados e o indivíduo esteja em uma dieta isenta de glúten há pelo menos 6 meses. Verificou-se que tem sido sugerido que apenas alguns cultivares de aveia não contaminada desencadeiam uma resposta imunológica em pacientes com DC, o que poderia explicar a inflamação mucosa crônica intestinal observada em alguns estudos. Uma diferença potencial na imunotoxicidade desses vários cultivares de aveia também pode explicar as diferentes respostas clínicas observadas, sendo necessárias mais pesquisas para esclarecer melhor o papel de diferentes cultivares de aveia na DC. Contudo, o acompanhamento regular de longo prazo de pacientes com DC ainda é recomendado além da dieta isenta de glúten, reafirmado como o único tratamento disponível. Portanto, confirmam-se as conclusões

feitas pela Health Canada sobre a segurança da introdução de aveia não contaminada na dieta isenta de glúten em indivíduos com DC.

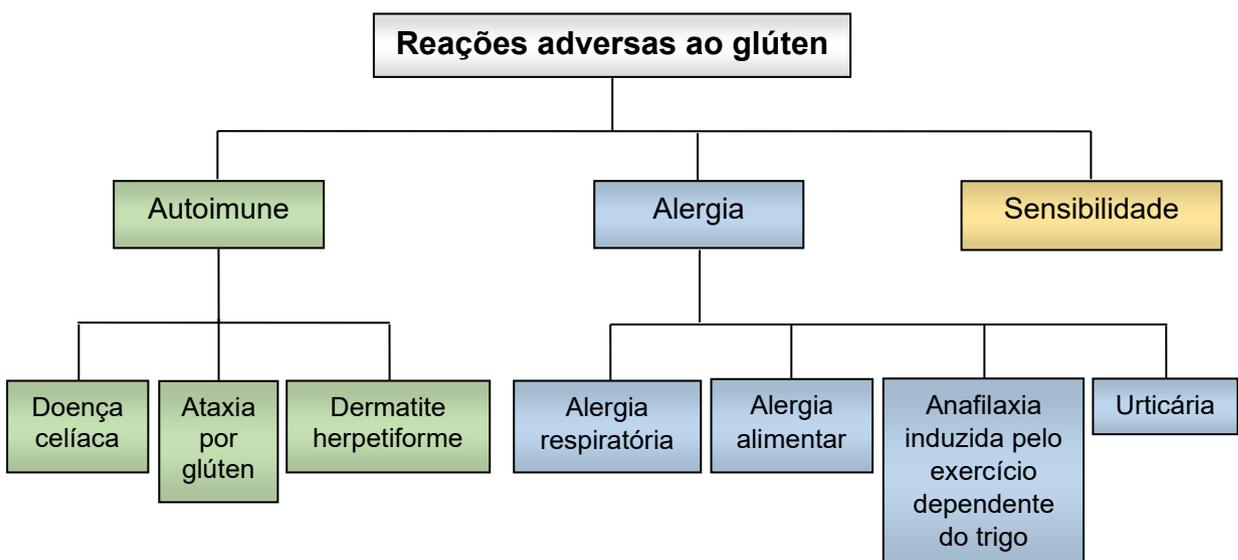
Por outro lado, o extrato de malte também deve ser excluído da dieta quando se pretende tê-la isenta de glúten. Este é produzido a partir de grãos de malte derivado da cevada. Dependendo da técnica de extração utilizada em sua produção, o extrato de malte pode conter glúten. Ellis; Freedman; Ciclitira (1990) demonstraram que o teor de hordeína em alimentos e bebidas foi frequentemente subestimado e consideraram produtos à base de cevada, como impróprios para pacientes com doença celíaca.

O glúten também pode estar presente em excipientes de cápsulas, comprimidos e suspensões orais de medicamentos. Este fato pode limitar a plena obediência à dieta sem glúten quando o paciente com DC tiver a necessidade de utilizar algum medicamento (SDEPANIAN *et al.*, 2001).

3.2 Desordens relacionadas ao glúten

As desordens relacionadas ao glúten são amplamente classificadas em reações auto-imunes (doença celíaca), reações alérgicas (alergia ao trigo) e as reações que não envolvem o sistema imune (intolerância ou sensibilidade ao trigo ou ao glúten), por isso é necessário se fazer uma distinção entre algumas patologias que envolvem o trigo ou o glúten visto que por vezes elas se confundem. **Figura 3** (SAPONE *et al.*, 2012).

Figura 3 – Classificações propostas de reações adversas ao glúten



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

As desordens relacionadas ao glúten estão emergindo como uma condição clínica relevante, juntamente com a crescente popularidade das dietas isentas de glúten. Um conhecimento mais aprofundado das diferenças e sobreposição em apresentações clínicas entre distúrbios glúten relacionados, e entre estes e outros distúrbios gastrointestinais, pode ajudar no processo de diagnóstico (ELLI *et al.*, 2015).

A alergia ao trigo é definida como uma reação imunológica imediata à ingestão de glúten, atinge cerca de 0,4% da população, estando entre as oito alergias alimentares mediadas por imunoglobulina E (IgE) mais comum nos Estados Unidos. Os anticorpos IgE mediam a resposta inflamatória a várias proteínas alergênicas tais como alfa-amilase/inibidor de tripsina, proteína de transferência de lípidos não-específica (nsLTP), gliadinas, gluteninas de alto peso molecular. A ingestão de glúten por indivíduos alérgicos pode desencadear sintomas cutâneos, gastrointestinais e respiratórios, dependendo da via de exposição (LEONARD; VASAGAR, 2014; LUDVIGSSON *et al.*, 2013, SAPONE *et al.*, 2012).

A sensibilidade ao glúten não-celíaca (SGNC) é uma condição clínica, considerada relativamente nova, desencadeada pela ingestão de glúten, levando a presença de sintomas intestinais e extra-intestinais que desaparecem com a retirada da proteína da dieta. No entanto, não se observa atrofia de vilosidades intestinais ou marcadores sorológicos compatíveis com a doença celíaca ou alergia ao trigo. Os sinais clínicos são diversos e envolvem dor e distensão abdominal, cefaleia, fadiga crônica, dores musculares, entre outros (CATASSI *et al.*, 2013; FASANO *et al.*, 2015). A fisiopatologia da SGNC não é clara e não há abrangentes estudos epidemiológicos publicados sobre este distúrbio, mas a prevalência é estimada entre 3 e 6% da população geral (LEONARD; VASAGAR, 2014).

3.3 A doença celíaca

A doença celíaca pode se apresentar na forma clínica clássica, não clássica, latente e assintomática (SDEPANIAN; MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999).

De acordo com Rauen; Back; Moreira (2005), a forma clássica da doença celíaca apresenta sintomas como diarreia ou constipação crônica, vômitos, emagrecimento, anorexia, irritabilidade, comprometimento variável do estado nutricional dentre outros sintomas e se manifesta principalmente nos primeiros anos de vida.

A forma não clássica da doença celíaca caracteriza-se por ausência de sintomas digestivos ou presença destes em segundo plano, sendo que os pacientes, geralmente crianças em idade mais avançada, podem apresentar manifestações isoladas, como baixa estatura, anemia por deficiência de ferro refratária à ferroterapia oral, artrite, constipação intestinal, osteoporose e esterilidade (PRATESI; GANDOLFI, 2005).

Identifica-se a forma latente da doença celíaca com biópsia jejunal normal em pacientes que estejam consumindo glúten, diferente das outras formas da doença, em que, o paciente pode apresentar atrofia subtotal das vilosidades intestinais que voltam a normalidade com a retirada do glúten da dieta (SDEPANIAN; MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999).

A doença celíaca assintomática, que ocorre comumente em familiares de primeiro grau de pacientes celíacos, teve seu reconhecimento aumentado em frequência a partir dos anos 90 com o desenvolvimento e emprego de marcadores sorológicos específicos utilizados no diagnóstico (SDEPANIAN; MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999). De acordo com Pratesi; Gandolfi (2005), quando temos a resposta sorológica à dieta isenta de glúten posteriormente a realização de rastreamento sorológico, utilizando os anticorpos antitrans-glutaminase e antiendomísio, com resultados positivos e confirmação de biópsia intestinal este rastreamento sorológico é aceito como diagnóstico definitivo. Além disso, permite a identificação de outras formas de manifestação da doença, além da digestiva (SDEPANIAN; MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999).

Múltiplos fatores devem ser considerados para o diagnóstico da doença celíaca. São eles, exame clínico, anamnese detalhada, análise histopatológica do intestino delgado e avaliação de marcadores séricos. Sendo que o diagnóstico final deve estar fundamentado na observação de alterações do intestino reveladas por meio de biópsias tais como vilosidades atrofiadas, alongamentos de criptas e aumento dos linfócitos intraepiteliais (BRASNKI; TRONCONE, 1998).

A DC é uma doença autoimune que causa intolerância permanente ao glúten, caracterizada por lesão inflamatória da mucosa intestinal do intestino delgado com atrofia total ou subtotal da mucosa predominantemente proximal e apresentando achatamento das vilosidades intestinais e hiperplasia das cristas e consequente má absorção de nutrientes essenciais para o bom funcionamento do organismo, em indivíduos geneticamente susceptíveis. Sendo assim é fundamental que o indivíduo

celíaco realize uma dieta permanente isenta de glúten (AGA, 2001; CESINO, 2010; DEWAR; CICLITIRA, 2005; SILVA; FURLANETTO, 2010).

Do ponto de vista epidemiológico, a DC está se configurando, progressivamente, como um problema de saúde pública podendo ser vista como a doença mais comum de fundo genético. Considerada, inicialmente, como uma doença de países europeus e da raça caucasiana, tem sido detectada, principalmente, durante a última década, em outras raças e outros continentes, com prevalências similares ou até mais expressivas que as encontradas na Europa (FASANO *et al.*, 2003). Era considerada rara até 2008 em populações africanas, porém os dados de diagnóstico estavam subestimados (CICLITIRA; KING; FRASER, 2001; COTON *et al.*, 2008).

Em populações brasileiras urbanas, a prevalência de DC apresenta diferenças regionais (ALENCAR *et al.*, 2012; GANDOLFI *et al.*, 2000). Isto pode ser devido à origem ancestral da população brasileira, que é derivada da mistura de africanos (principalmente Bantu), europeus (principalmente portugueses) e índios da América do Sul (GODINHO *et al.*, 2008).

No Brasil, os dados estatísticos oficiais são desconhecidos, havendo uma estimativa de 300 mil brasileiros portadores da doença (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Apesar da escassez de dados oficiais de prevalência no Brasil, em estudo realizado na cidade de São Paulo, em 4.000 amostras de soros obtidas a partir de doadores de sangue, de ambos os sexos, com idades entre 18 e 65 anos, excluídos os com DC reconhecida, foi estimada uma prevalência de 1:286, semelhante àquelas observadas em países Europeus e nos Estados Unidos (ALENCAR *et al.*, 2012).

Também foram estudadas 10 comunidades brasileiras afrodescendentes no Nordeste do Brasil, em que se testou anticorpos imunoglobulina A (Ig A). Os níveis de imunoglobulinas foram normais e os resultados dos testes de IgA-endomisial se apresentaram negativos para todos os 840 indivíduos avaliados (ALMEIDA *et al.*, 2012). Já em um estudo realizado na cidade de Brasília, com 2.045 doadores de sangue, aparentemente saudáveis, encontrou-se uma prevalência de DC não diagnosticada de 1: 681 (0,17%). Estes resultados apoiam a visão de que a DC não é uma doença rara no Brasil, mesmo que a prevalência desse transtorno seja menor do que a encontrada na maioria dos países europeus e que sua prevalência pode variar conforme diferenças regionais (GANDOLFI *et al.*, 2000).

A confirmação do diagnóstico da DC é baseada na correlação entre a anamnese e o exame de biopsia intestinal, mesmo que a sorologia seja positiva. A biopsia também

é utilizada para avaliar o grau de lesão do intestino delgado. No Brasil, apesar do diagnóstico ser realizado gratuitamente por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), a maioria dos pacientes com DC não possuem este diagnóstico. Há indícios de que a prevalência de DC vem aumentando nos últimos anos (SILVA; FURLANETTO, 2010). Tal fato se deve principalmente pelo avanço dos métodos de diagnósticos que tem possibilitado a identificação inclusive de casos de DC nas formas atípicas e assintomáticas, através do rastreamento sorológico (CATASSI, 2005).

O tratamento para a doença celíaca exige a adesão, ao longo da vida, de uma dieta isenta de glúten e sua eliminação de todos os alimentos e medicamentos. A oferta de alimentos apropriados para celíacos, em sua maioria, é de alto custo, e poucos estabelecimentos de alimentação estão preparados para recebê-los. Tais fatos dificultam a realização da dieta interferindo diretamente no convívio social e estilo de vida do celíaco, uma vez que alimentar-se fora de casa pode ser um ato inseguro (GREEN *et al.*, 2001).

A dieta isenta de glúten é um tratamento médico crítico para milhões de indivíduos com DC em todo o mundo, uma condição autoimune para a qual nenhuma outra terapia está atualmente disponível. Atualmente, a prevalência de CD está aumentando, refletida pela crescente conscientização na comunidade científica. Este aumento na prevalência e consciência da DC, no entanto, não explica o aumento desproporcional no crescimento da indústria alimentar sem glúten. De acordo com pesquisas de mercado, os consumidores sem CD compram a maior quantidade de produtos sem glúten (REILLY, 2016).

O mercado oferece uma série de produtos isentos de glúten que podem ser consumidos pelos pacientes. No entanto, estes devem estar atentos a fontes "ocultas" de glúten, que são usadas como ingredientes funcionais em produtos como molhos, carnes e peixes (DAY *et al.*, 2006).

O constante aumento da comercialização dos produtos isentos de glúten também é devido ao consumo destes entre os membros da família e amigos de pacientes celíacos, que apesar de saudáveis, os consomem (ARRANZ *et al.*, 2015).

Outro obstáculo são os produtos que não contêm glúten na lista de ingredientes, mas poderiam ter sido contaminados durante a produção. A fim de evitar qualquer tipo de contaminação, os ingredientes que contêm glúten necessitam ser armazenados e manipulados em áreas estritamente separadas dos demais produtos sem glúten. Com base nisso, é recomendado que pacientes que apresentem doenças relacionadas com

o glúten adquiram produtos que tenham rotulagem e certificação “*Gluten-free*” (THOMPSON; SIMPSON, 2015).

A fim de minimizar tais dificuldades, foi criada no Brasil uma entidade sem fins lucrativos, a Associação dos Celíacos do Brasil (ACELBRA), que auxilia os celíacos e seus familiares através de orientações sobre a DC, na busca por alternativas alimentares, proporcionando a troca de experiências entre os associados, elaborando informativos e exigindo o cumprimento da legislação vigente (ACELBRA-MG, 1997).

3.4 Legislação no Brasil e no exterior

No Brasil, a Lei No 8.543, de 23 de dezembro de 1992 determinou a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contivessem glúten, a fim de evitar o agravamento da DC (BRASIL, 1992). No ano de 2002, a Resolução RDC nº 40 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que trata da rotulagem de alimentos e bebidas embalados que contenham glúten, estendeu a obrigatoriedade de rotulagem para as bebidas e especificou para alimentos que continham glúten, como trigo, aveia, cevada, malte e centeio e/ou seus derivados, a advertência "CONTÉM GLÚTEN" (BRASIL, 2002). Em maio de 2003, foi publicada a Lei 10.674/2003, que determinou o destaque nos rótulos com as inscrições "contém Glúten" ou "não contém Glúten", conforme o caso (BRASIL, 2003). Esta lei não determina um limite numérico para o qual o alimento é considerado com ou sem glúten.

De acordo com o *Codex Alimentarius* (2015) temos duas definições de alimentos sem glúten ou com teor reduzido:

- 1) Os alimentos sem glúten são aqueles constituídos/fabricados com ingredientes que não contêm trigo, centeio, cevada, aveia ou suas variedades, ou que foram especialmente processados para removê-lo, e o nível de glúten não deve exceder 20 mg/kg no total, com base no alimento, tal como vendido ou distribuído para o consumidor.
- 2) Os alimentos especialmente processados para reduzir o teor de glúten são aqueles cujos ingredientes de trigo, centeio, cevada, aveia ou suas variedades cruzadas, que foram especialmente tratados para reduzir o teor de glúten para um nível acima de 20 até 100 mg/kg no total, com base no alimento, tal como vendido ou distribuído para o consumidor.

A maioria dos regulamentos de rotulagem, no mundo, relativos ao glúten, são baseados na norma do *Codex Alimentarius*. Apesar disso, a implementação nacional de normas equivalentes apresenta diferenças importantes entre os países e depende de decisões das autoridades locais (DIAZ-AMIGO; POPPING, 2012).

Em 2009, a União Europeia incorporou os limites propostos pelo *Codex Alimentarius* à sua legislação. A comissão da União Europeia dispõe sobre conteúdo e rotulagem de produtos para pessoas intolerantes ao glúten na legislação *Commission Regulation* (EC) N° 41/2009. Nesta regulamentação, está prevista a utilização das menções “teor muito baixo de glúten” ou “isento de glúten” para quantidades máximas de 100 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente, na rotulagem de produtos, exceto em fórmulas para lactentes e fórmulas de transição (EC, 2009; DIAZ-AMIGO; POPPING, 2012).

Na Austrália e Nova Zelândia, “alimento isento de glúten” é aquele que não contém o trigo, o centeio, a cevada, a aveia e as suas estirpes hibridizadas; ou que tenha conteúdo de glúten que não exceda a 20 mg/kg (AUSTRALIA, 2016).

O *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos da América, publicou, em 2014, um guia orientativo para indústria. Nele são considerados “*Gluten-free*” tanto os alimentos em que não se utilize ingredientes que contenham glúten como aqueles nos quais houve modificação e o teor de glúten é inferior a 20 mg/kg no produto acabado (FDA, 2014).

Na **Tabela 2** são apresentadas as principais referências para rotulagem de glúten, por órgão regulamentador e fiscalizador.

Tabela 2 – Limites de glúten estabelecidos por cada órgão para declaração de rotulagem.

Órgão	Limite de glúten estabelecido	Referência
<i>Food and Drug Administration</i>	≤ 20 mg/kg = livre de glúten	FDA, 2014
<i>Food Standards Agency</i>	≤ 20 mg/kg = livre de glúten	EC, 2009
	≤ 100 mg/kg = muito baixo em glúten	
<i>Codex Alimentarius Commission</i>	≤ 20 mg/kg = livre de glúten	Codex, 2015
	≤ 100 mg/kg = reduzido em glúten	
<i>Food Standard Code</i>	≤ 20 mg/kg = livre de glúten	Australia, 2016
ANVISA	Ausente	Brasil, 2003

Fonte: LAUREANO, 2010 (modificado).

Na Argentina, a utilização do termo “isento de glúten” exige o relato de verificação analítica pelas autoridades e o uso de boas práticas de fabricação para evitar contaminação cruzada. No Canadá, quando o alimento não contém trigo, aveia, cevada, centeio, triticale ou qualquer derivado, ele é considerado isento de glúten. Além disso, exige-se que fabricantes de alimentos e instalações de atacado e varejo tomem providências para garantir a não ocorrência de contaminação cruzada com glúten. A regulamentação não inclui limites permitidos de glúten (CANADA, 2011; DIAZ-AMIGO; POPPING, 2012).

No Chile, a regulação também inclui a definição do termo “isento de glúten” e requer o uso das boas práticas de fabricação como requisito para a alegação de ausência de glúten no alimento. O controle laboratorial anual dos alimentos com o rótulo “isento de glúten” é exigido pela organização de celíacos do Chile, assim como a implementação de uma política de produção isento de glúten com pontos críticos de controle para as empresas que desejam manter o selo (CONVIVIR, 2016; DIAZ-AMIGO; POPPING, 2012).

No Brasil, em julho de 2015, a ANVISA publicou a Resolução RDC nº 26 que trata sobre a rotulagem dos principais alimentos causadores de alergias (BRASIL, 2015). Esta resolução tem similaridade tanto com o *Codex Alimentarius* quanto com o regulamento da União Europeia para os tipos de alimentos que devem ser declarados como alergênicos. Porém, no que tange a DC a aplicação da legislação se faz por meio do uso da Lei 10.674/2003 e não da Resolução RDC nº 26/2015 que trata da declaração de trigo, centeio, cevada, aveia e suas estirpes hibridizadas diferentemente da declaração de presença/ausência de glúten.

Cabe ressaltar que diferentemente das legislações utilizadas no exterior, o Brasil não adota um limite de teor de glúten nos alimentos como forma de classificá-los e não exige a realização de análises laboratoriais, obrigatoriamente como forma de determinação de seus teores. Infelizmente não existe um consenso entre os países para o emprego do termo “Gluten-free” ou “livre de glúten” em alimentos (THOMPSON; MÉNDEZ, 2008).

3.5 A fiscalização de alimentos no âmbito da Vigilância Sanitária

A Constituição Brasileira declara que saúde é um direito social resultante de diversas condições, tais como alimentação, educação, trabalho, renda, acesso aos serviços de saúde, dentre outras, garantido por meio da implantação de políticas econômicas e sociais, que devem promover a integração de diversos setores do governo. O SUS é o meio de concretização desse direito (BRASIL, 1988).

A Lei Orgânica da Saúde, nº 8080/1990, dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde e tem como campo de atuação do SUS as ações em vigilância sanitária. O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) definido na lei nº 9782/1999 criou a ANVISA para coordenar suas ações em nível nacional e promover a proteção da saúde da população (BRASIL, 1990b, 1999).

A ANVISA é o órgão responsável pela coordenação das ações do SNVS em nível nacional e tem as atribuições de normatizar, controlar e fiscalizar produtos, substâncias e serviços de interesse para a saúde; acompanhar e coordenar as ações estaduais, distritais e municipais de vigilância sanitária. Todas as suas atividades se embasam no processo e nos riscos associados ao consumo dos alimentos. Dentre os produtos submetidos a sua jurisdição incluem-se os alimentos, as bebidas, seus insumos, embalagens (rótulos), aditivos alimentares entre outros (BRASIL, 1999).

A Vigilância Sanitária (VISA) Estadual de Minas Gerais tem por finalidade garantir a gestão do Sistema Estadual de Saúde nas regiões do Estado, assegurando a qualidade de vida da população. A VISA tem função de planejar, coordenar, executar, acompanhar e avaliar as ações de vigilância sanitária em alimentos em Minas Gerais, que incluem o gerenciamento de risco, o monitoramento da qualidade, o registro, a notificação de alimentos, a regulação sanitária e ações interinstitucionais (MINAS GERAIS, 2016).

O Instituto Octávio Magalhães (IOM) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) é o Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (LACEN-MG) e integra os sistemas de vigilância epidemiológica, sanitária e ambiental. Seu trabalho está voltado para a prevenção e controle de doenças e para a promoção da saúde. É responsável, entre outras atribuições, pelas análises físico-químicas dos alimentos coletados pelas VISA(s) municipais (FUNED, 2015; VALLADÃO, 2012).

Os programas de monitoramento da qualidade dos alimentos são fundamentados no controle e fiscalização de diversos produtos alimentícios expostos ao consumo, na avaliação do padrão sanitário por meio de análises e na fiscalização dos dizeres obrigatórios das embalagens e seus rótulos. Os programas fornecem resultados analíticos que permitem traçar o perfil dos distintos alimentos e identificar os setores produtivos que necessitam de intervenção institucional de abrangência nacional de caráter preventivo e corretivo, a fim de garantir a melhoria da qualidade sanitária dos alimentos comercializados no país. Os principais critérios para seleção das categorias de alimentos monitorados são pautados em relevância do consumo por parte da população, risco epidemiológico, disponibilidade no mercado local, histórico de frequentes irregularidades, viabilidade de colheita da amostra, viabilidade de análise laboratorial (ANVISA, 2001, 2016; LIMA; MODERNELL, 2009; VALLADÃO, 2012).

O Programa de Monitoramento da qualidade de Alimentos do estado de Minas Gerais (PROGVISA) é uma das ações da VISA, que atua por meio da Gerência de Vigilância Sanitária de Alimentos, das gerências e superintendências regionais de saúde e do LACEN-MG que ocorre anualmente desde o 2000. O PROGVISA fornece dados relativos à qualidade dos alimentos comercializados em Minas Gerais que servirão de subsídio para o planejamento e estruturação das ações de promoção e proteção à saúde, como também para elaboração ou revisão da legislação sanitária. Se a análise indicar irregularidade, ações são tomadas objetivando a proteção da saúde do consumidor, como interdição cautelar do produto, a instauração de processo administrativo sanitário, notificação da empresa e fiscalização sanitária do estabelecimento produtor (MINAS GERAIS, 2016).

As ações de vigilância sanitária são realizadas com referência na “Análise de Risco”, que torna possível a obtenção de informações acerca dos perigos envolvidos nos alimentos monitorados. Com vistas ao controle dos riscos identificados são adotadas medidas de intervenção e disponibilizadas informações para que sejam tomadas as providências cabíveis (ANVISA, 2016).

Os alimentos monitorados são coletados pela VISA em conformidade com a Lei nº 13.317, de 24 de setembro de 1999 – Código de Saúde do Estado de Minas Gerais, que estabelece normas para a promoção e a proteção da saúde no Estado e define a competência do Estado no que se refere ao Sistema Único de Saúde - SUS. (MINAS GERAIS, 1999; FUNED, 2015).

3.6 A importância da rotulagem de alimentos no controle da DC

Os rótulos são considerados elementos essenciais de comunicação entre produtores e consumidores por conter informações estratégicas que auxiliam nos tratamentos de redução dos riscos de doenças crônicas, tais como: diabetes melitus (açúcar), hipertensão arterial (sal), doença celíaca (trigo, aveia, centeio e cevada), intolerância à lactose (leite e derivados) entre outras. O consumidor obtém informações sobre os alimentos por meio do conhecimento transmitido pela família, mídia, educação, publicidade, profissionais de saúde e dos próprios rótulos. Levantamento de informações realizado junto à população demonstrou que aproximadamente 70% das pessoas consultam os rótulos dos alimentos no momento da compra (DIAS; PRADO; GODOY, 2008).

De acordo com Sdepanian *et al.* (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.

No Brasil, as informações fornecidas através da rotulagem contemplam um direito assegurado pelo Código de Defesa do Consumidor (CDC), aprovado por meio da Lei Federal nº. 8.078/90 que, em seu artigo 31º, trata das condições para oferta e apresentação de produtos ou serviços e prevê que as informações devem ser asseguradas em língua portuguesa e de forma correta, clara, precisa e ostensiva sobre “suas características, qualidades, quantidade, composição, preço, garantia, prazos de validade e origem, entre outros dados, bem como sobre os riscos que apresentam a saúde e segurança dos consumidores” (BRASIL, 1990a).

Morais *et al.* (2014), evidenciaram que aproximadamente 50% dos alimentos analisados, de uso rotineiro na dieta e produtos de interesse para os celíacos, continham informações incorretas quanto à presença de glúten, contrariando a regra de rotulagem do CDC para que o consumidor possa fazer sua opção de compra de acordo com suas necessidades e peculiaridades. E concluem que para atendimento à população celíaca, existe a necessidade de uma mobilização por parte dos fabricantes, cujos rótulos constam a inscrição “não contém glúten”, para que garantam a qualidade dos produtos de acordo com as informações relatadas. Quanto à Vigilância Sanitária,

se faz necessário definir uma política de fiscalização, através do monitoramento, com realização de análises laboratoriais, dos produtos coletados no mercado.

Muraro *et al.* (2014), relatam que a rotulagem indicando a presença não intencional de alérgeno, por precaução, só deve ser usada quando há uma probabilidade significativa de contaminação cruzada representando risco inaceitável para o consumidor alérgico.

O uso indiscriminado de rotulagem por precaução leva à perda de confiança por parte do consumidor alérgico (CREVEL *et al.*, 2014).

Vista a necessidade de uma alimentação com restrição ao glúten por parte dos celíacos, reforça-se a importância do monitoramento da fidelidade das informações “contém Glúten” e “não contém Glúten”, por comprovação analítica para que o rótulo possa cumprir seu papel informativo.

3.7 Determinação de glúten em alimentos

A avaliação do conteúdo de glúten em alimentos de ingrediente único ou cereais foi investigado em vários estudos (DOSTÁLEK *et al.*, 2009; GELINAS *et al.*, 2008; KOERNER *et al.*, 2011, 2013; THOMPSON; LEE; GRACE, 2010), sendo escasso este conhecimento em alimentos de multi ingredientes.

No Brasil, entre os anos de 2001 e 2014, foram realizados 11 diferentes estudos para determinação de glúten em diversos tipos de alimentos que englobavam os produzidos de forma caseira por celíacos, industrializados, prontos para o consumo em restaurantes, produtos de panificação, entre outros. As análises foram realizadas por metodologias distintas em diferentes trabalhos apresentados na **Tabela 3** utilizando metodologias como imunoenensaio enzimático, eletroforese em gel de poliacrilamida, Western Blot e cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 3 - Estudos de determinação de glúten em alimentos, realizados no Brasil de 2001 a 2014.

Tipos de alimentos	Nº de amostras	Método	LD/LQ (mg de glúten/kg)	Insatisfatório (%) para NCG	Referência / Estado
Produtos de milho e mandioca, pão de queijo, sobremesa de gelatina, leveduras, café, molhos e temperos, sopas, massas de arroz, lácteos, salsicha, refrigerantes e pastas de dente. (109 caseiros e 81 industrializados)	190	ELISA - Lab-Test, Eletroforese e Western Blotting	LD = 80	0,9 (caseiros) 11 (industrializados)	SDEPANIAN <i>et al.</i> , 2001 SP
Produtos de panificação, cerveja, achocolatado, molhos e temperos, salsichas, linguiças e sopas desidratadas.	177 (98 "NCG" e 79 "CG")	ELISA - Lab Kit	LD NC	80,6	PICCOLOTO, 2002 SP
Produtos de arroz e milho, biscoitos salgado e chips, lasanha, farinha de soja e macarrão.	13	ELISA - Tepnel BioSystems	LD NC LQ = 10	7,7	ABREU <i>et al.</i> , 2006 SP
Papas, farinhas, cereais, bolachas e pão.	15 (8"CG"e 7 "NCG")	CLAE	LD = 93 LQ = 281,8	14,3	MEIRINHO, 2009 SP
Tortilhas doces e salgadas a base de farinha de arroz.	10	ELISA - Transia® Plate	LD = 3	100	BICUDO, 2010 PR
Farinhas (milho, arroz, mandioca, soja, banana), biscoitos, salgadinhos, barra de cereal/granola, pão de queijo, massas, tempero em pó, sopas e outros.	70	ELISA - Transia® Plate e RIDA®Quick Gliadin ELISA	LD = 4 LQ = 5 LD = 5	28,6	LAUREANO, 2010 RS
Produtos à base de arroz, milho, mandioca, batata e quinua.	213 (115 "NCG", 86 "SG" e 12 "CG")	Ridascreen® Gliadin e Western Blotting	LD = 3 LQ = 5	13	SILVA, 2010 SP

Legenda: LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; "NCG": não contém glúten; "CG": contém glúten; "SG": naturalmente sem glúten; PRC: reação em cadeia de polimerase; NC: não consta.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Continua

Tabela 3 – Estudos de determinação de glúten em alimentos, realizados no Brasil de 2001 a 2014 (Continuação).

Tipos de alimentos	Nº de amostras	Método	LD/LQ (mg de glúten/kg)	Insatisfatório (%) para NCG	Referência / Estado
Feijão cozido pronto para consumo (coletado em 20 restaurantes, 3 amostras/cada, em dias distintos)	60	BiokitsGlutenAssay Kit®.	LD = 1	25	OLIVEIRA, 2013 DF
Biscoitos	30 (15 "NCG" e 15 "CG")	ELISA Ridascreen® Gliadin e PCR	LD = 3 LQ = 5	6,7	PIRES, 2013 RJ
Pão de queijo ou biscoito de queijo; biscoito de polvilho; bolo de mandioca/milho/fubá ou pão sem glúten (coleta em 25 panificadoras do DF)	130	ELISA Ridascreen® Gliadin	LD = 3 LQ = 5	21,5	GOUVEIA, 2014 DF
Batata frita ondulada, polvilho doce, creme de arroz, fécula de batata, farofa de soja e fubá de milho	11 (6 "NCG" e 5 "CG")	ELISA Ridascreen® Gliadin	LD = 3 LQ = 5	16,7	MORAIS <i>et al.</i> , 2014 RJ

Legenda: LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; "NCG": não contém glúten; "CG": contém glúten; "SG": naturalmente sem glúten; PRC: reação em cadeia de polimerase; NC: não consta.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Pôde-se perceber, que a partir de 2001 a 2014 houve uma evolução nos métodos. Em 2001, Sdepanian *et al.* analisaram 190 amostras utilizando imunoensaio enzimático com um LD de 4 mg de gliadina/100 g, correspondente a 80 mg de glúten/kg de alimento, e confirmou os resultados por Western Blot (WB). Apesar da análise por WB ter reportado mais resultados positivos e provavelmente pelo fato de se ter uma reação cruzada do anticorpo policlonal, não foi observada diferença estatística entre os métodos.

Em 2002, Piccoloto conduziu um estudo utilizando um ELISA sanduiche para o qual amostras consideradas “baixo teor de glúten” possuíam abaixo de 0,016% que se convertidos correspondem a um teor de glúten de 160 mg/kg de alimento.

No ano de 2006, notou-se uma redução do valor do LD que passou para 10 mg de glúten/kg de alimento em outro kit comercial (Abreu *et al.*, 2006).

Meirinho (2009) realizou um estudo utilizando CLAE e obteve um LD de 46,5 mg de gliadina / kg, correspondendo a 93 mg de glúten / kg de alimento.

Três estudos, realizados em 2010, em que foram utilizados kits comerciais de determinação de glúten por imunoensaio enzimático com LD de 3 e 4 mg de glúten/kg, níveis muito mais baixos do que os até então empregados. Nos três estudos foram pesquisados alimentos que não continham glúten e, em um deles, foram pesquisados também alimentos com a declaração “Contém glúten”, mas sem ingrediente fonte. Dois destes estudos estabeleceram o teor de 20 mg de glúten/kg e alimento como ponto de corte visto o teor estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (BICUDO, 2010; LAUREANO, 2010; SILVA, 2010).

Em 2013, tanto Oliveira quanto Pires avaliaram a presença de glúten em alimentos por imunoensaio enzimático com LD de 1 mg de glúten/kg e 3 mg de glúten/kg em amostras de feijão cozido pronto para o consumo em restaurantes e em biscoitos com e sem glúten, respectivamente. Pires fez uma comparação do método de ELISA com reação em cadeia de polimerase (PCR) e encontrou DNA de trigo em todas as amostras analisadas. Porém, a análise de PCR detectou DNA da espécie de grão e não necessariamente glúten.

Gouveia (2014) analisou amostras com declaração “Não contém glúten”, pelo método ELISA, com LD de 3 mg de glúten/kg e utilizou o teor de glúten de 20 mg/kg como ponto de corte em função da determinação do *Codex Alimentarius* encontrando 21,5% de resultados insatisfatórios.

Destes 11 estudos realizados no Brasil, quatro foram executados com o kit Ridascreen® Gliadin em produtos de padaria, biscoitos com e sem glúten, alimentos naturalmente sem glúten, alimentos direcionados para celíacos rotulados “Não contém glúten” e alimentos rotulados “Contém glúten”, mas a presença de ingredientes fonte de glúten não foi descrita na lista de ingredientes.

Vista a complexidade do tema e a prevalência descrita, internacionalmente, foram realizados muitos estudos para pesquisa e determinação de glúten em alimentos. Como se acreditava que a DC era uma doença de populações europeias, são muitos os trabalhos realizados na Europa, 12 (60%) dos trabalhos aqui reportados.

Percebeu-se que o imunoensaio foi muito utilizado, uma vez que 75% (15) dos estudos utilizaram esta técnica como único método de detecção ou o utilizaram como método comparativo. Dos 15 imunoensaios realizados seis eram Ridascreen® Gliadin, método normalizado e recomendado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2012a).

Na **Tabela 4**, estão apresentados dados de alguns trabalhos realizados, internacionalmente, entre os anos de 1993 e 2015.

Tabela 4 - Estudos internacionais de determinação de glúten entre 1993 e 2015.

Tipos de alimentos	Nº de amostras	Método	LD/LQ (mg de glúten/kg)	Insatisfatório (%)	Referência / País
Ingredientes e aditivos "gluten free" (19); alimentos "gluten free" (10); alimentos suspeitos de (6)	35	Gluten Lab Kit e PCR	NI	<u>Ingredientes e aditivos</u> : 15,8% (farinhas de arroz) <u>"NCG"</u> : 80% <u>Alimentos suspeitos</u> : 66,7% (ausência no condimento e cereal de arroz).	ALLMANN <i>et al.</i> , 1993 Suíça
<u>Alimentos "NCG"</u> : Pães (4), produtos de pastelaria (2), milho (1), baby food (8).	15	WBR-PCR e RIDASCREEN	NI	20%. Maiores problemas: pão, painço e baby-food	DAHINDEN; BÜREN; LUTHY., 2001 Suíça
<u>Produtos de aveia</u> - 88. Destes, 10 eram rotulados como 100% aveia. <u>Produtos naturalmente "NCG"</u> - 22 arroz, milho, painço e trigo-sarraceno	110	Transia Gluten lab-test e PCR (confirmatório do ELISA)	LD = 20	<u>Produtos de aveia</u> : 50% <u>"NCG"</u> : 40,9%	STORSRUD; YMAN; LENNER, 2003 Suécia
Alimentos declarados "NCG" (45); alimentos sem ingrediente fonte – SIFG (15)	60	Citometria de fluxo	LD= 10	<u>"NCG"</u> : 13,3%. <u>"SIFG"</u> : 13,3%	CAPPARELLI <i>et al.</i> , 2005 Itália
Maltes (11), amostras durante o processo de fabricação (5) e Cervejas (19)	35	ELISA Ridascreen® Gliadin	LD = 3 LQ = 5	<u>Maltes</u> : 100% <u>Cervejas</u> : 63,2%	DOSTÁLEK <i>et al.</i> , 2006 Espanha
Farinhas de amaranto, soja e milho (4) e biscoitos "NCG" (13).	17	PCR	42 ± 12 pg (LD)	17,6%	OLEXOVÁ <i>et al.</i> , 2006 Eslováquia
Produtos de cereais, sendo declarados "NCG" (77) e os demais sem declaração, mas a base de ingredientes sem glúten (71) (batata, tapioca, soja).	148	ELISA Ridascreen® Gliadin	LQ = 5	Naturalmente sem glúten:22,5% <u>"NCG"</u> : 9%	GÉLINAS <i>et al.</i> , 2008 Canadá

Legenda: * proteína de trigo; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; "NCG": não contém glúten; "CG": contém glúten; NI: não informado; PRC: reação em cadeia de polimerase; ND: não detectado; SG: sem glúten; SIFG: sem ingrediente fonte de glúten; DC: doença celíaca; e TT: tratado termicamente.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Continua

Tabela 4 – Estudos internacionais de determinação de glúten entre 1993 e 2015 (Continuação).

Tipo de alimentos	Nº de amostras	Método	LD/LQ (mg de glúten/kg)	Insatisfatório (%)	Referência / País
"NCG" (17): muesli (similar a granola), cereal de arroz, cereal de milho, shake e pão de centeio. "CG" (8): sêmola, triticale (cereal híbrido de trigo e centeio) e outros.	25	ELISA Ridascreen® Gliadin DNA - PCR, SureFood® Prep Allergen kit	LD = 3 LQ = 5 -	"NCG": 76,5%	CAWTHORN; STEINMAN; WITTHUHN, 2010 África do Sul
Farinhas, sementes, chips, granolas hambúrguer, biscoitos e barras de cereal de quinoa, amaranto e/ou chia.	37	ELISA Ridascreen® Gliadin	LQ = 5	24,3%	LÓPEZ <i>et al.</i> , 2010 Argentina
Farinhas de cereais diversos; pó para chá gelado, massas, molho, pão, bolacha, vinagre branco, snack, creme dental e loção p/ o corpo, bebidas alcoólicas (28) "NCG": cerveja, massas diversas, pão, salgadinhos, barra de proteína, cereais de quinoa, temperos e biscoitos (12)	40	CLAE MS/MS	0,001 a 0,0035 mg/kg (LD) e 0,01 a 0,1 mg/kg (LQ) para 6 peptídeos.	Bebidas e molhos: 50% Produtos de higiene: 33,3% "NCG": 8,3%	SEALEY-VOYKSNER <i>et al.</i> , 2010 Estados Unidos
Arroz, farinhas de arroz, milho, sorgo e soja, polenta, trigo mourisco, farinha de trigo, semente de amaranto, semente de linho, grãos de milho	22	kit ELISA Ridascreen® Gliadin	LD = 3 LQ = 5	22,7% milhos em grão, farinha de trigo sarraceno e farinhas de soja	THOMPSON; LEE; GRACE, 2010 Estados Unidos
Alimentos "SG": cookies, muffins, pão de ló, gaspacho (sopa fria espanhola) e aspargo.	5	Kit Glutentox competitive ELISA Injeção de fluxo - IF com eletrodo de referência (Ag/AgCl/KCl 3 M)	LQ = 5 e LD = 1,26	0%	AMAYA-GONZALEZ <i>et al.</i> , 2011 Espanha

Legenda: * proteína de trigo; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; "NCG": não contém glúten; "CG": contém glúten; NI: não informado; PRC: reação em cadeia de polimerase; ND: não detectado; SG: sem glúten; SIFG: sem ingrediente fonte de glúten; DC: doença celíaca; e TT: tratado termicamente.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Continua

Tabela 4 – Estudos internacionais de determinação de glúten entre 1993 e 2015 (Continuação)

Tipo de alimentos	Nº de amostras	Método	LD/LQ (mg de glúten/kg)	Insatisfatório (%)	Referência / País
Alimentos "NCG": obtidos a partir de arroz, milho, soja e tremço: farinhas, farinhas para bebês, pães, biscoitos e cereais (7) Alimentos "CG": similares aos anteriores, só que obtidos de trigo (8) Produtos cárneos (16); Misturas de especiarias/temperos (5)	15	CLAE-DAD e por potenciômetro (língua eletrônica)	CLAE LD = 46.5 LQ = 140.9 Língua = 2	"NCG": 14,3%	PERES <i>et al.</i> , 2011 Portugal
	21	Kit ELISA RIDASCREEN® Fast Gliadin	LQ = 10	Cárneo: 6,3% Mistura de tempero: 20%	MATI; STARUCH, 2012 Eslováquia
<u>Alimentos TT e hidrolisados (23)</u> : baby food, biscoitos, cereais, massas, cereais infantis, xarope de milho, bebida de malte, amido de trigo. <u>Alimentos TT e não hidrolisados (8)</u> : pão, farinha de milho torrada, pastas, pastel e amido de trigo. <u>Alimentos não TT e hidrolisados (6)</u> : cervejas. <u>Alimentos não TT e não hidrolisados (9)</u> : sobremesas, macarrão de arroz, cacau solúvel, soja, bebida de soja. <u>"NCG"</u> : hambúrguer, salsicha, almôndegas, espetos de carne, peito de peru, embutidos de carne, presunto, mortadela, salame, bacon e outros	46	kit ELISA Ridascreen® Gliadin e kit ELISA Ridascreen® Gliadin Competitive	LD = 3 LQ = 5 e LQ = 10	<u>TT e hidrolisados</u> : 47,8% <u>TT e não hidrolisados</u> : 75% <u>Não TT e não hidrolisados</u> : 22,2%	MENA <i>et al.</i> , 2012 Espanha
	100	Imunoensaio - Glúten Assay Kit	LD = 1	0%.	CAMPAGNA <i>et al.</i> , 2013 Itália

Legenda: * proteína de trigo; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; "NCG": não contém glúten; "CG": contém glúten; NI: não informado; PRC: reação em cadeia de polimerase; ND: não detectado; SG: sem glúten; SIFG: sem ingrediente fonte de glúten; DC: doença celíaca; e TT: tratado termicamente.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Continua

Tabela 4 – Estudos internacionais de determinação de glúten entre 1993 e 2015 (Continuação).

Tipo de alimentos	Nº de amostras	Método	LD/LQ (mg de glúten/kg)	Insatisfatório (%)	Referência / País
"NCG": doces, maionese de milho, mix de panqueca, snack de abóbora, leite desnatado, spaguetti em molho de tomate, snack de batata doce, sopa de tomate, sopa cremosa de cogumelos (12). "CG": sopas, biscoitos e torrada (8).	20	Imunoensaio por fluorescência (IMB) e kit ELISA Ridascreen® Gliadin	LD = 1,2 LD = 3 LQ = 5	"NCG": 55%	CHU; WEN, 2013 Taiwan
<u>Hidrolisados</u> : cervejas e outros líquidos (06). <u>Não hidrolisados</u> : farinhas de milho, arroz e amêndoa; quinoa, líquidos e chamtor (11). <u>Outras amostras</u> : capuccino, flocos de aveia e milho, sobremesa de chocolate, bolo, snack fit, sobremesas (10).	27	Eletroquímica - amperometria	LD = 0,5	<u>Hidrolisados</u> : 100% <u>Não hidrolisados</u> : 54,5% <u>Outras amostras</u> : 50%	AMAYA-GONZALEZ et al, 2015 Espanha
"NCG" (275) e "CG" (186) sem ingrediente fonte: grãos, castanhas, legumes; molhos e condimentos; mistura para sopa; pastas; cereais de café da manhã; snacks e barrinhas; bebidas, sorvetes e sobremesas geladas; cárneos e outros.	461	2 kits ELISA Morinaga (Japão) Ridascreen® Gliadin	LQ = 0,3* LD = 3 LQ = 5	"NCG": 1,1% "CG": 80,6% DECLARAÇÃO PREVENTIVA!!! Em 82 produtos (17,8%).	SHARMA; PEREIRA; WILLIAMS, 2015 Estados Unidos
"NCG": Ingredientes para panificação, bebidas, cookies, crackers, condimentos, produtos de panificação, grãos, farinhas, entradas, cereais, misturas, sopas, pimentas, suplementos, tortilhas, pastas, snacks, nozes e sementes (46 certificados)	158	kit ELISA: Ridascreen® Gliadin e Ridascreen® Gliadin Competitive	LQ = 5 e LQ = 10	"NCG" sem certificação: 5,4% "NCG" com certificação: 4,3%	THOMPSON; SIMPSON, 2015 Estados Unidos

Legenda: * proteína de trigo; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; "NCG": não contém glúten; "CG": contém glúten; NI: não informado; PRC: reação em cadeia de polimerase; ND: não detectado; SG: sem glúten; SIFG: sem ingrediente fonte de glúten; DC: doença celíaca; e TT: tratado termicamente.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Verificou-se que dentre os estudos realizados não houve uma classificação dos alimentos quanto às categorias propostas tanto pelo *Codex Alimentarius* quanto pela ANVISA. Esta classificação facilitaria a comparação de resultados (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Categorização de alimentos por órgão de referência.

		Categorias de alimentos	
	<i>Codex Alimentarius</i>		ANVISA
01.0	Produtos lácteos e análogos excluindo produtos da categoria 02.0	1	Leite e derivados
02.0	Gorduras e óleos e gorduras emulsificadas	2	Óleos e gorduras
03.0	Gelados comestíveis, incluindo sorvete	3	Gelados comestíveis
04.0	Frutas e vegetais (incluindo cogumelos, raízes, tubérculos e leguminosas, e aloe vera), algas, nozes e sementes	4	Frutas e hortaliças
05.0	Confeitaria	5	Balas, confeitos, bombons, chocolates e similares
06.0	Cereais e produtos de cereais, derivados de grãos de cereais, de raízes e tubérculos, leguminosas, legumes e medula ou miolo de palmeira, com exclusão de produtos de panificação da categoria de alimentos 07.0	6	Cereais e produtos de ou a base de cereais
07.0	Produtos de panificação	7	Produtos de panificação e biscoitos
08.0	Carne e produtos de carne, incluindo aves e caça	8	Carnes e produtos cárneos
09.0	Peixe e seus derivados, incluindo moluscos, crustáceos, e equinodermes	9	Pescados e produtos de pesca
10.0	Ovos e produtos de ovos	10	Ovos e derivados
11.0	Adoçantes, incluindo o mel	11	Açúcar e mel
		12	Sopas e caldos
12.0	Sais, especiarias, sopas, molhos, saladas, produtos proteicos	13	Molhos e condimentos
		14	Produtos proteicos e leveduras
13.0	Gêneros alimentícios destinados a uma alimentação especial	15	Alimentos para fins especiais
		16	Bebidas
14.0	Bebidas, excluindo produtos lácteos	17	Café, chá, erva mate e outras ervas similares
15.0	Guloseimas prontas para o consumo	18	Petiscos (snacks)
		19	Sobremesas e pós para sobremesas
16.0	Alimentos preparados	20	Preparações culinárias industriais
		21	Alimentos enriquecidos ou fortificados
		22	Suplementos nutricionais
		23	Preparados para adicionar ao leite
		24	Outros

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

3.8 Métodos de detecção e quantificação do glúten

A padronização de um método para a determinação do teor de glúten nos alimentos tem como limitação o fato do glúten ser uma mistura complexa de proteínas encontradas em vários cereais diferentes com variabilidade natural no perfil de proteínas, determinado geneticamente e influenciado pelo ambiente (HISCHENHUBER *et al.*, 2006). Além disto, existem questões relacionadas a natureza heterogênea dos alimentos e dificuldade de quantificar glúten em produtos processados que passaram por aquecimento ou quando o glúten se encontra parcialmente hidrolisado (BARBOSA; ABREU; ZENEON, 2007).

Cada vez mais os métodos de detecção analítica de glúten têm sido desenvolvidos, com base em técnicas, tais como ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA (MORÓN *et al.*, 2008; VALDÉS *et al.*, 2003), eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) (WAGA; ZIENTARSKI, 2007), reação em cadeia da polimerase (PCR) (MUJICO *et al.*, 2011; SANDBERG *et al.*, 2003), dispositivo de fluxo lateral /dipstick (ALLRED; PARK, 2012), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (WIESER; ANTES; SEILMEIER, 1998) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (ABBOTT *et al.*, 2010; MANFREDI *et al.*, 2015).

Todos os tipos de métodos, sejam para determinação de elevados ou baixos teores de glúten, são bastante caros e muitas vezes exigem uma preparação apropriada da amostra (CZAJA; MAZUREK; SZOSTAK, 2016).

A seleção de um método para a análise de glúten é altamente dependente da aplicação ou a especificidade e a sensibilidade requerida. Portanto, além da seleção da técnica de medição mais precisa e sensível, é recomendável o uso de um material de referência internacionalmente reconhecido para que comparações interlaboratoriais sejam possíveis (HISCHENHUBER *et al.*, 2006).

O efeito da extensa desnaturação de proteínas durante o processo tecnológico envolvido na produção de alimentos prejudica a imuno especificidade dos métodos de análise (DENERY-PAPINI; NICOLAS; POPINEAU, 1999).

A estabilidade do DNA e a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica altamente específica e sensível, fornecem marcadores moleculares quantitativos para detectar e diferenciar glúten de trigo de glúten de outros cereais homólogos (DEBNATH; MARTIN; GOWDA, 2009). Contudo, os métodos de PCR são

caracterizados por baixa repetibilidade de resultados (CZAJA; MAZUREK; SZOSTAK, 2016; FREEDMAN *et al.*, 1987). O método de PCR, com base na detecção de DNA específico de trigo é utilizado como método de comparação de resultados com métodos imunológicos para medição de gliadina em amostras de alimentos (ALLMANN *et al.*, 1993; DAHINDEN; BÜREN; LUTHY, 2001; DEBNATH; MARTIN; GOWDA, 2009; MUJICO *et al.*, 2011).

O uso de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (MS) é uma alternativa para análise de glúten por meio de peptídeos marcadores. No entanto, o método demonstra limitações de uso para produtos fermentados, provavelmente devido ao processo de cozimento, que reduzem a extração do glúten. Porém, esta técnica possibilita discriminar, com boa concordância, os ingredientes fontes de glúten presentes em alimentos processados (ou industrializados/ ultraprocessados) (MANFREDI *et al.*, 2015). Uma desvantagem do uso de MS é o alto custo do equipamento (HARASZI *et al.*, 2011). As técnicas de espectroscopia, infravermelho médio, infravermelho próximo e Raman, dentre outras, são técnicas que oferecem vantagens sobre os métodos químicos tradicionais. Estas são não destrutivas, exigem pouca ou nenhuma preparação da amostra, não produzem resíduos e tem capacidade de avaliar vários componentes simultaneamente a partir de um único espectro (CZAJA; MAZUREK; SZOSTAK, 2016).

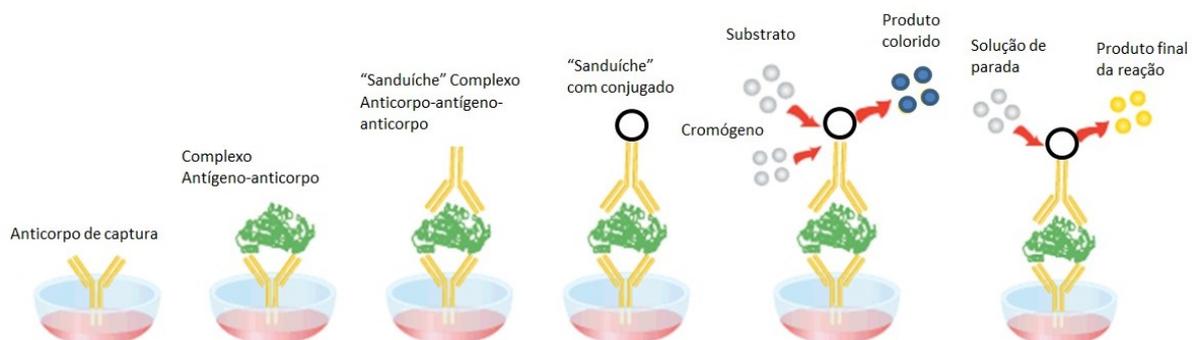
Os métodos imunológicos são métodos à base de proteínas, envolvem a reação anticorpos contra alérgenos purificados. O emprego de métodos imunológicos para detecção de glúten parece ser a metodologia mais sensível disponível, principalmente o ELISA, uma vez que se baseia em anticorpos monoclonais e policlonais diferentes (HISCHENHUBER *et al.*, 2006; MENA *et al.*, 2012; SHARMA; PEREIRA; WILLIAMS, 2015; VALDÉS *et al.*, 2003).

Os métodos ELISA, são fáceis de usar, e muitos analistas estão familiarizados com esta técnica. Além disso, o equipamento para os testes ELISA é relativamente barato e amplamente disponível (HARASZI *et al.*, 2011).

A AOAC recomenda a utilização do método 2012.01, Método Imunoenzimático com base em anticorpo monoclonal específico para sequencias de aminoácidos prolamina potencialmente tóxicos para celíacos (AOAC, 2012a). O pentapeptídeo Glutamina-Glutamina-Prolina-Fenilalanina-Prolina (QQPFP) presente nas subunidades α -, β -, γ - e ω - gliadinas, em hordeínas e secalinas, permite detectar glúten das prolaminas do trigo, centeio e cevada. Este método foi validado por avaliação

interlaboratorial (VALDÉS *et al.*, 2003), e se baseia na reação antígeno-anticorpo. Ao adicionar o padrão, ou uma solução de amostra nos poços com anticorpos específicos para gliadinas, estas ligam-se aos anticorpos de captura específicos. O resultado é um complexo de antígeno-anticorpo. Os componentes não ligados pelos anticorpos são então removidos numa etapa posterior de lavagem. Em seguida é adicionado o anticorpo conjugado a peroxidase que está ligado ao complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ab). Um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo (sanduíche) é formado. Todo conjugado de enzima não ligado é então removido por lavagem. O substrato enzimático e o cromógeno são adicionados aos poços e incubados. O conjugado de enzima é incolor e quando ligado ao cromógeno produz uma cor azul. A adição de um reagente de parada interrompe a reação e resulta na mudança de cor de azul para amarelo (**Figura 4**). A medição é feita por fotometria a 450 nm em leitor de ELISA. A absorbância (ABS) é proporcional à concentração de gliadina da amostra, e a quantificação é realizada através de curva de calibração com padrões em concentrações conhecidas (R-BIOPHARM, 1988).

Figura 4 – Princípio do método de ELISA



Fonte: http://www.leinco.com/sandwich_elisa (modificado), 2016.

Considerando a produção global de farinha, as preparações para refeições e o aumento da incidência da doença celíaca, a simplificação dos procedimentos analíticos é extremamente vantajosa. Portanto, optou-se pelo ELISA como método de detecção de glúten no presente estudo.

3.9 Avaliação de desempenho e incerteza de medição

Vários são os documentos que podem ser utilizados como referência na estruturação de procedimentos de validação intralaboratorial de métodos analíticos. No Brasil, o documento orientativo de referência é o DOQ-CGCRE-008 do INMETRO, que tem como documentos complementares guias e normas tais como a ABNT NBR ISO/IEC 17025, o guia EURACHEM 2014, o Vocabulário Internacional de Metrologia de 2012, dentre outros (INMETRO, 2016).

De acordo com o EURACHEM (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014), para métodos normalizados, tais como as publicações ISO ou *American Society for Testing and Materials* (ASTM), não é necessária a validação pelo laboratório, utilizando tal método. No entanto, o laboratório precisa verificar o desempenho do método tal como descrito na ABNT NBR ISO/IEC 17025, item: 5.4.2: “O laboratório deve confirmar que ele pode operar adequadamente métodos padrão antes de introduzir os ensaios ou calibrações” (ABNT, 2005).

O laboratório deve atender aos requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17.025 para a seleção, desenvolvimento, utilização de métodos não normalizados e validação de métodos. É fundamental comprovar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. O laboratório, ao utilizar métodos normalizados, deve demonstrar que possui condições adequadas de operá-los, dentro das especificidades existentes em suas instalações. Para os métodos normalizados, o laboratório deve, obrigatoriamente, estudar os parâmetros referentes à recuperação/tendência e precisão em toda a faixa de trabalho, LD e LQ, desde que os parâmetros de validação estejam declarados nos métodos em questão e estejam adequados ao uso pretendido. Geralmente esse estudo é chamado de verificação. Se o método normalizado mudar, a verificação deve ser repetida (INMETRO, 2016; ABNT, 2005).

Uma ampla revisão foi elaborada por SOUZA (2007) a fim de propor um protocolo de validação embasado em normas nacionais e internacionais e critérios estatísticos. Os principais parâmetros estudados na validação intralaboratorial de métodos quantitativos são: linearidade, sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, veracidade, precisão e limites de detecção e quantificação (SOUZA, 2007; INMETRO, 2016).

3.9.1 Parâmetros para verificação de desempenho do método quantitativo

Limite de detecção (LD)

Segundo o Vocabulário internacional de Metrologia (VIM) o termo limite de detecção (LD) é o valor medido e obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência de um constituinte num material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença (VIM, 2012).

De acordo com INMETRO (2016), o LD de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições estabelecidas para o ensaio e uma das formas de se calculá-lo é a partir do LQ por meio da **Equação 1**:

$$LD = LQ / 3,3 \quad (\text{Eq. 1})$$

Limite de quantificação (LQ)

Segundo INMETRO (2016) o LQ é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e veracidade aceitáveis. O método analítico deve ser específico e o LQ para cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico. A matriz da amostra usada para determinar o LQ deve ser identificada. A concentração do LQ é sempre igual ou maior que o primeiro ponto da curva analítica. Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica. Nesse caso, é importante incluir um controle no método, em concentração equivalente ao LQ, para acompanhar o desempenho nessa concentração e fornecer dados para a reestimação periódica do mesmo com os dados de controle. É importante salientar que para estimar o LQ de um método, análises devem ser realizadas em amostras, incluindo todas as etapas do procedimento analítico.

Na prática, o LQ corresponde, normalmente, ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Esse limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes no mesmo nível de concentração/propriedade do LQ, para averiguar se a recuperação/tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias. Quando pertinente, adota-se um número de seis replicatas. O LQ é importante para métodos quantitativos (INMETRO, 2016).

Veracidade

Segundo o Vocabulário internacional de Metrologia o termo veracidade é o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência (VIM, 2012).

Com a impossibilidade de se realizar infinitas medições, a veracidade não pode ser expressa. Realiza-se, então, uma avaliação prática da veracidade em termos de tendência que é oriunda dos erros sistemáticos inerentes ao método. Quatro abordagens estão disponíveis para se estudar a tendência: i) análise de materiais de referência certificados (MRC); ii) análise de materiais de referência (MR)0; iii) estudo de recuperação usando amostras adicionadas do analito; e iv) comparação com resultados obtidos por outro método (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Precisão intermediária

Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição, as três maneiras mais comuns de expressar a precisão são por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo, usualmente, expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação.

O coeficiente de variação (CV, expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma (**Equação 2**):

$$CV = DPR = (DP / CMD) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo:

DP é o desvio padrão;

CMD é a concentração média determinada.

A repetibilidade é a precisão de medição realizada de maneira idêntica no processo de medição, incluindo, mesmos operadores, sistema de medição condições de operação e local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, num curto intervalo (INMETRO, 2016).

A precisão intermediária, por sua vez, refere-se à precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição tal como citado para repetibilidade, porém, ao longo dum período extenso, mas pode incluir outras condições submetidas às mudanças. Nesse estudo, deve-se definir exatamente quais condições serão variadas (uma ou mais), tais como diferentes analistas; diferentes equipamentos

e diferentes tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório. Na maioria dos casos, o valor de precisão intermediária é função do nível de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados discrepantes (VIM, 2012).

A reprodutibilidade é a precisão de medição sob um conjunto de condições que incluem diferentes locais, diferentes operadores, diferentes sistemas de medição e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares (INMETRO, 2016).

HorRat

A fração ou valor *Horwitz* é um parâmetro simples que reflete a aceitabilidade de um método químico de análise no que diz respeito à precisão.

O valor HorRat para reprodutibilidade, é o valor do DPR ou CV da reprodutibilidade dividido pelo valor do DPR ou CV da reprodutibilidade calculado a partir da equação de *Horwitz*, na concentração de interesse (**Equação 3**).

$$\text{HorRat} = \text{DPR}_R \text{ estimado} / \text{DPR}_R \text{ teórico} \quad (\text{Eq. 3})$$

Se os valores de *HorRat* forem menores ou iguais a 2, os valores da reprodutibilidade dos métodos podem ser considerados satisfatórios (INMETRO, 2016; HORWITZ; ALBERT, 2006).

Registros da aplicabilidade

Após a validação, os dados registrados devem fornecer, as informações de desempenho e identidade do analito com sua identificação/especificação, a faixa de concentração compreendida pela validação, a caracterização do material testado com a faixa de trabalho da validação, um protocolo descrevendo equipamento, reagentes, procedimento com as variações permitidas, calibração e procedimentos da qualidade, além dos critérios de segurança; e a aplicação para o método, incluindo a incerteza dos componentes críticos (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

3.9.2 Incerteza de medição

Incerteza é um intervalo associado a um resultado que demonstra os valores que podem ser atribuídos ao mensurando. Uma estimativa de incerteza deve levar em consideração todas as fontes de impacto no resultado. As incertezas associadas com cada etapa do processo devem ser combinadas (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014).

De acordo com o conceito do VIM (2012) incerteza de medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, inclui componentes de efeitos sistemáticos, tais como aqueles associados a correções e a valores atribuídos a padrões, assim como a incerteza definicional. Algumas vezes, ao invés de serem corrigidos os efeitos sistemáticos são incorporados aos componentes de incerteza de medição associadas. A incerteza de medição geralmente engloba muitos componentes. Alguns deles podem ser estimados a partir da distribuição estatística dos valores provenientes de séries de medições e podem ser caracterizados por desvios padrão (avaliação do Tipo A da incerteza de medição). Outros podem ser caracterizados por desvios padrão estimados a partir de funções de densidade de probabilidade baseadas na experiência ou em outras informações (avaliação do Tipo B da incerteza de medição). Para um dado conjunto de informações, tem-se uma incerteza de medição associada a um mensurando. Se esse mensurando é modificado ocorre uma modificação da incerteza associada.

O método formal para calcular a incerteza da medição é sua estimativa, geralmente feita por meio de uma equação. Os procedimentos de validação de métodos são planejados para que a equação utilizada na estimativa do resultado, considere erros aleatórios de todos os tipos, seja uma expressão válida que os englobe e que tenha efeitos significativos naquele resultado (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A incerteza padrão combinada (u_c) é a combinação das incertezas de cada um dos efeitos operacionais reconhecidos e pode ser calculada conforme a **Equação 4**:

$$u_c = \sqrt{u_{rel}^2(1) + u_{rel}^2(2) + u_{rel}^2(3) + u_{rel}^2(n)} \quad (\text{Eq. 4})$$

A incerteza padrão expandida, simbolizada pela letra U é obtida multiplicando-se a incerteza padrão combinada pelo fator de abrangência (k) (**Equação 5**):

$$U = K * u_c \quad (\text{Eq. 5})$$

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios imunoenzimáticos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Química Bromatológica – LQB, do Serviço de Química e do laboratório do Serviço de análise de Produtos para Saúde. As análises de rotulagem foram realizadas pelo Laboratório de Rotulagem do Serviço de Gerenciamento de Amostras, todos da Divisão de Vigilância Sanitária – DIVISA da FUNED.

Os materiais e equipamentos de medição utilizados neste trabalho possuíam calibrações ou qualificações vigentes, realizadas por empresas acreditadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC).

Todos os reagentes e padrões utilizados foram de grau de pureza apropriado, cujos valores encontram-se descritos em seus respectivos certificados de análise. Os kits para análise estavam acompanhados de certificado de desempenho e das soluções padrão, necessários à construção da curva de calibração.

4.1 Amostragem

Foram selecionados, para determinação de glúten, alguns grupos de alimentos para análise, de acordo com a categorização da ANVISA (**Tabela 6**), considerando: i) as informações dos alimentos mais consumidos entre os celíacos (FENACELBRA, 2010); ii), os tipos de alimentos analisados; iii) e os produtos reportados com ocorrência de contaminação cruzada (AMAYA-GONZALES *et al.*, 2011; CAMPAGNA *et al.*, 2013; GÉLINAS *et al.*, 2008; LAUREANO, 2010; MORAIS *et al.*, 2014; SHARMA; PEREIRA; WILLIAMS, 2015; SILVA, 2010; THOMPSON; SIMPSON, 2015).

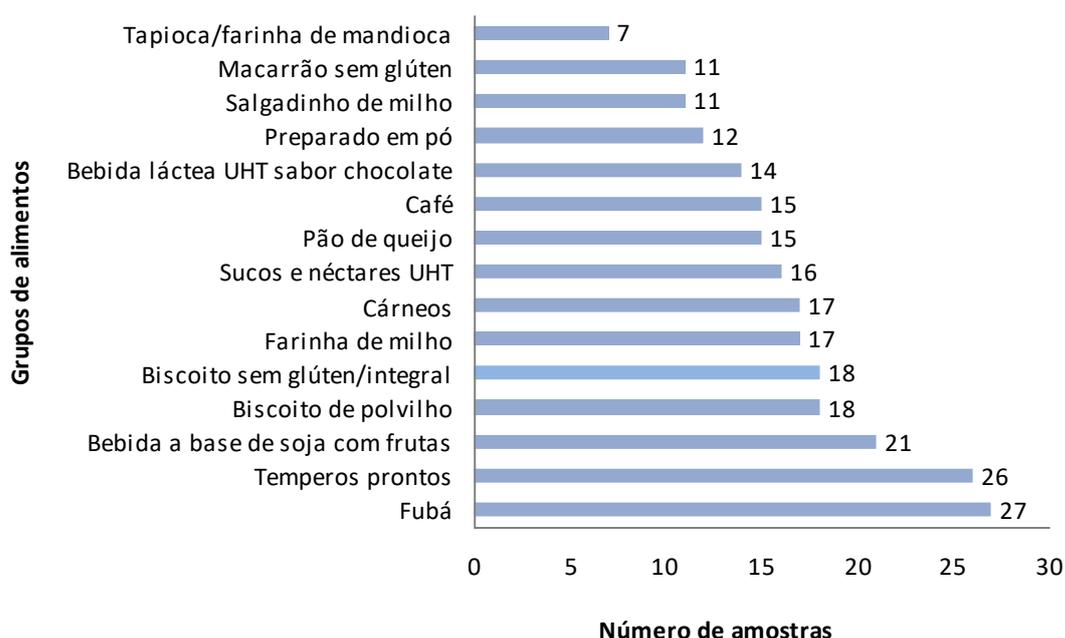
Tabela 6 - Alimentos analisados quanto ao teor de glúten segundo categorização da ANVISA.

Categoria	Alimentos
1) Leite e derivados	- bebida láctea UHT sabor chocolate.
6) Cereais e produtos de ou a base de cereais	- farinha de milho; - fubá; - preparados em pó: farinha de arroz, creme de milho e amido de milho; - macarrão sem glúten.
7) Produtos de panificação e biscoitos	- biscoito de polvilho; - biscoitos sem glúten/integral.
8) Carnes e produtos cárneos	- hambúrgueres; - salsichas; - mortadelas.
13) Molhos e condimentos	- temperos prontos (tablete ou pó).
16) Bebidas	- bebida a base de soja com suco de frutas; - sucos e néctares UHT.
17) Café, chá, erva mate e outras ervas similares	- café torrado e moído.
18) Petiscos (snacks)	- salgadinho de milho.
20) Preparações culinárias industriais	- pão de queijo.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

A coleta das amostras foi realizada pela VISA através das VISAs municipais entre março de 2015 e setembro de 2016. As amostras analisadas no presente trabalho fizeram parte do PROGVISA. Ao todo foram avaliadas 245 amostras, de 15 tipos, totalizando 157 marcas comercializadas no estado de Minas Gerais (**Figura 5**), sendo amostrados mais de 10 alimentos por categoria, com exceção da tapioca e da farinha de mandioca em que foram amostrados 5 e 2 alimentos, respectivamente, sem direcionamento de marcas. A declaração “Não contém glúten” foi priorizada na coleta de amostras.

As amostras foram encaminhadas ao LQB e utilizadas na realização da análise de glúten e, posteriormente, os rótulos foram encaminhados ao Laboratório de Rotulagem.

Figura 5 – Número de amostras analisadas para cada grupo de alimentos

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

4.2 Soluções

Diluyente de amostras (diluição 1 + 4 com água ultrapura): 4 mL do diluyente concentrado foram adicionados a 16 mL de água ultrapura e homogeneizados. Esta quantidade foi suficiente para a análise de 10 amostras em duplicata. Esta solução foi preparada no momento do uso.

Tampão de lavagem (diluição 1 + 9 com água ultrapura = 25 mL + 225 mL): 25 mL do tampão concentrado, medidos com o auxílio de proveta de 25 mL, foram transferidos para balão volumétrico de 250 mL, contendo aproximadamente 100 mL de água ultrapura, completou-se o volume e homogeneizou-se. Esta solução foi estável por 4 semanas, estocada entre 2 e 8 °C, em frascos apropriados.

Conjugado enzima-anticorpo (diluição 1+10 com água ultrapura): de acordo com o número de poços a ser analisado, o volume recomendado de conjugado foi acrescido do volume de água correspondente, ambos medidos com o auxílio de pipetadores automáticos (**Tabela 7**), seguido de homogeneização com movimentos suaves. Esta diluição foi realizada no momento do uso.

Tabela 7 - Volumes de conjugado enzima-anticorpo e água ultrapura utilizados para diluição do conjugado enzima-anticorpo em função do número de poços utilizados.

Número de poços	Volume de conjugado (μL)	Volume de água (μL)
24	250	2.500,0
32	350	3.500,0
40	400	4.000,0
48	500	5.000,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Solução de etanol a aproximadamente 40% (v/v): 200 mL de etanol absoluto, medidos com o auxílio de proveta de 500 mL, foram transferidos para balão volumétrico de 500 mL, contendo aproximadamente 100 mL de água ultrapura, completou-se o volume e homogeneizou-se. Esta solução teve validade de 6 meses estocada a temperatura ambiente em frascos apropriados.

Solução de etanol a aproximadamente 60% (v/v): 300 mL de etanol absoluto, medidos com o auxílio de proveta de 500 mL, foram transferidos para balão volumétrico de 500 mL, contendo aproximadamente 100 mL de água ultrapura, completou-se o volume e homogeneizou-se. Esta solução teve validade de 6 meses, estocada a temperatura ambiente em frascos apropriados.

Solução de etanol a aproximadamente 80% (v/v): 400 mL de etanol absoluto, medidos com o auxílio de proveta de 500 mL, foram transferidos para balão volumétrico de 500 mL, contendo aproximadamente 50 mL de água ultrapura, completou-se o volume e homogeneizou-se. Esta solução teve validade de 6 meses, estocada a temperatura ambiente em frascos apropriados.

OBSERVAÇÃO: os preparos das soluções de etanol foram calculados usando-se álcool etílico PA com concentração de 99%, mas poderia ser utilizado outro álcool, desde que respeitadas as proporções.

4.3 Descontaminação e preparo do ambiente, embalagens e materiais

Para a realização da determinação de glúten foi necessário segregar e tratar todos os materiais utilizados na análise, as embalagens das amostras e utilizar área de análise dedicada, a fim de se evitar contaminações com fontes de glúten, uma vez que no LQB são realizadas análises de amostras diversas. A cada batelada analítica, a sala destinada à análise teve seu piso, paredes, bancadas e capela lavados com detergente neutro, enxaguada com água comum, água ultrapura e, posteriormente, foi aplicada solução de álcool etílico a 40%. As embalagens das amostras e os materiais também foram tratados com solução de álcool etílico a 40%, com auxílio de gaze.

A eficácia do processo de limpeza do ambiente foi avaliada por meio da realização de testes rápidos de detecção da presença de glúten utilizando-se um método imunocromatográfico qualitativo, aproximadamente 2 - 4 µg glúten/100 cm² (RIDA® QUICK Gliadin) em 3 bateladas de análise distintas, escolhidas aleatoriamente.

Para a realização do teste, pipetou-se 500 µL de tampão para o tubo de ensaio, com o auxílio da pipeta descartável. Esfregou-se a extremidade inferior (zona de reação) da tira de teste sobre uma área de 10 x 10 cm e colocou-se a tira, com a seta apontando para baixo, no tubo de ensaio com tampão, tomando o cuidado de não mergulhar a tira além da linha máxima. Retirou-se a tira de teste após cinco min. e leu-se o resultado, visualmente, com auxílio da ficha de avaliação. Geralmente, quanto maior o nível de analito na amostra, mais forte é a cor vermelha da faixa de teste (R-Biopharm, 2015a) (**Figura 6**).

Figura 6 – Ficha de avaliação: resultados positivos, negativos e inválidos.



Legenda: a: resultado negativo; b: resultado positivo para diferentes níveis de concentração; c: resultado inválido.

Fonte: R-Biopharm – RIDA®QUICK Gliadin, 2015a (modificado).

4.4 Determinação do teor de glúten pela quantificação da gliadina

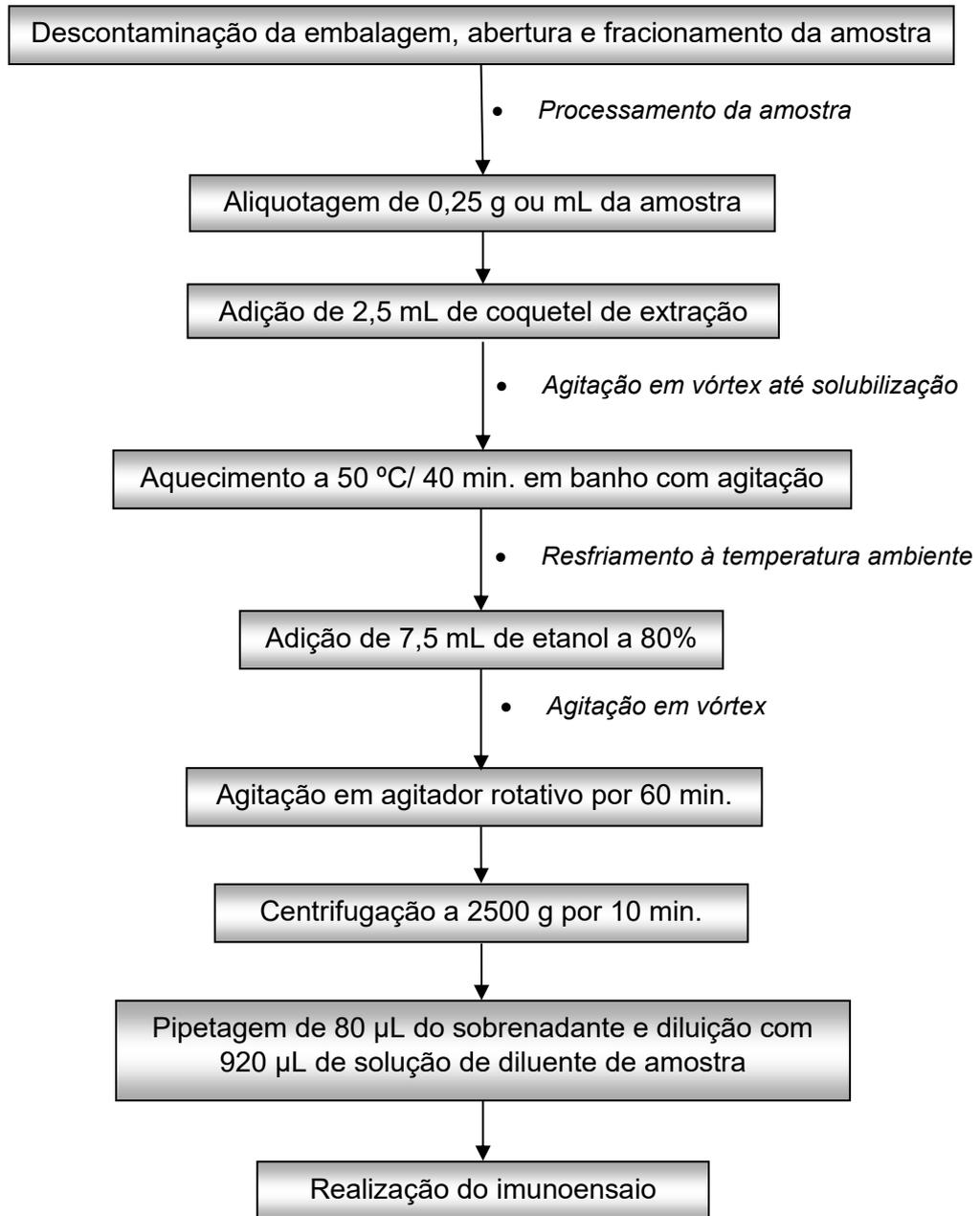
A determinação de gliadina foi feita conforme *Official Method 2012.01* (AOAC, 2012a), método específico para analisar glúten sob a forma de gliadina em alimentos contendo trigo, centeio e cevada que, de acordo com a metodologia, permite detectar níveis de até 1,5 mg de gliadina/kg ou 3,0 mg de glúten/kg, em alimentos industrializados. O limite de quantificação informado foi de 2,5 mg de gliadina/kg ou 5,0 mg de glúten/kg (R-BIOPHARM, 2012).

4.4.1 Preparo e extração da amostra

As amostras foram processadas, uma a uma, de acordo com sua natureza física. As líquidas foram homogeneizadas por inversão na própria embalagem entre 5 e 6 vezes, seguido da retirada de uma porção de aproximadamente 20 mL para armazenamento. As pastosas foram quarteadas e homogeneizadas, com auxílio de gral e pistilo, e retirado aproximadamente 5 g. As amostras sólidas foram cortadas em pedaços menores/adequados, uma porção de aproximadamente 5 g foi triturada em moinho analítico (IKA modelo A11 Basic), até a obtenção de partículas finas e homogêneas, e passada em tamis de 42 *Mesh*.

Todas as amostras foram acondicionadas em frascos plásticos de boca larga com tampa, identificadas para análise de glúten, e armazenadas em local apropriado de acordo com a natureza da amostra (temperatura ambiente: 20 a 25 °C, refrigeração: 2 a 8 °C ou congelamento: -18 a -30 °C). Amostras líquidas tiveram 250 µL pipetados e amostras sólidas ou pastosas tiveram aproximadamente 0,250 g pesados em balança analítica (resolução de 0,0001g – Mettler Toledo modelo AG 285), todas em duplicata, para tubos *Falcon* de 15 mL. Foram adicionados 2,5 mL do coquetel de extração, utilizando pipetador automático. A mistura foi homogeneizada com auxílio de agitador mecânico tipo *Vórtex*, para solubilização da amostra e, em seguida, aquecida a 50 °C por 40 min. em banho de água com agitação constante e vigorosa. Esfriou-se a temperatura ambiente. Após esta etapa inicial, todas as seguintes foram executadas entre 20 e 25 °C.

Adicionou-se 7,5 mL da solução de etanol a 80%, utilizando pipetador automático. Agitou-se em *Vórtex* por 10 segundos e por inversão, em agitador rotativo por 60 min. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a aproximadamente 2.500 g, em centrífuga de *Gerber* (raio de 25 cm – Fanem modelo 202), por 10 min., utilizando-se o sobrenadante para análise. Diluiu-se a amostra na proporção 1:12,5, utilizando 80 µL do sobrenadante e 920 µL de solução de diluente, a fim de se obter soluções que se enquadrassem na faixa de quantificação do kit de análise (**Figura 7**). O fator de diluição final foi de 500 (AOAC, 2012a).

Figura 7 – Fluxograma de preparo e extração da amostra

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

4.4.2 Preparo do material de referência

Foram utilizados três MR sendo um branco de glúten, um de teor nominal 23,6 mg de glúten/kg e um de teor nominal 41,8 mg de glúten/kg.

Pesou-se cerca de 1,0000 g de cada MR e adicionou-se 10 mL de etanol a 60%, com auxílio de pipetador automático. Agitou-se a mistura em *vórtex*, por pelo menos 30 segundos, e por inversão em agitador rotativo, por 10 min. Centrifugou-se em centrífuga de *Gerber* por 10 minutos a aproximadamente 2500 *g*.

Para os MR branco de glúten e de teor 23,6 mg de glúten/kg, diluiu-se o sobrenadante 1:50 e para o MR de teor 41,8 mg de glúten/kg, diluiu-se o sobrenadante 1:50 e, posteriormente, 1:2 com solução diluente de amostra.

4.4.3 Preparo da curva de calibração

Para cada batelada analítica elaborou-se uma curva de calibração utilizando-se 100 μ L de cada solução de padrão fornecida pelo fabricante no kit, em duplicata, nas seguintes concentrações: 0, 5, 10, 20, 40, e 80 μ g/kg de gliadina.

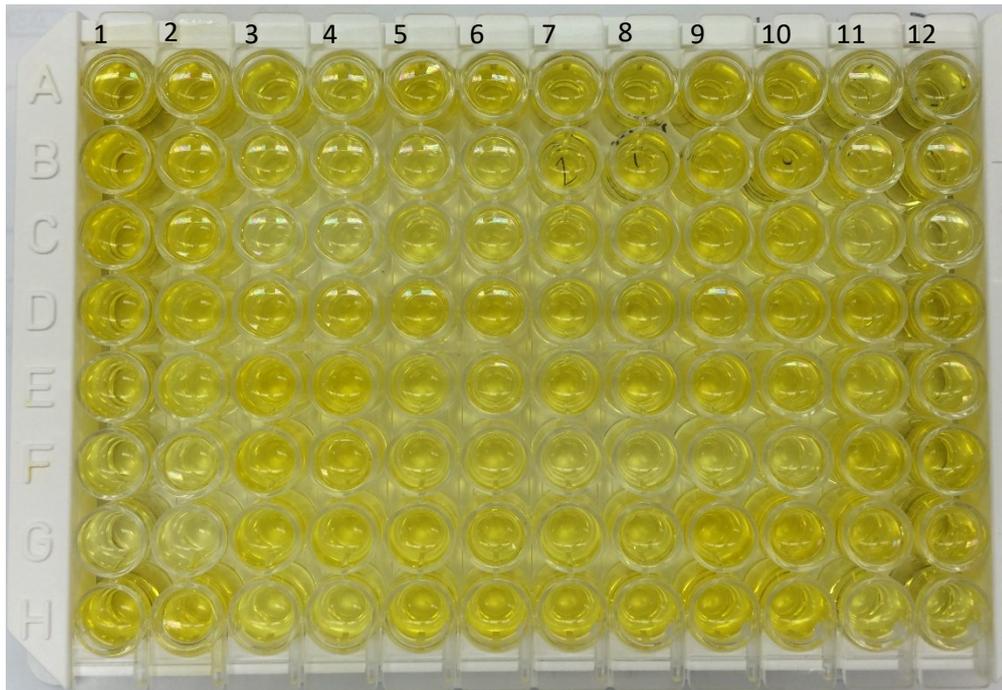
De acordo com informação do fabricante, o critério para aceitação da curva de calibração é a similaridade entre o perfil da curva padrão pré-traçada para cada lote do kit e o da curva obtida para este mesmo lote a cada batelada analítica. Também é recomendada a não utilização da curva caso a absorvância (ABS) medida para a concentração de 80 μ g/kg seja menor que 0,600 (R-Biopharm, 2012).

4.4.4 Realização do imunoensaio

A cada poço do kit adicionou-se, individualmente, amostras extraídas, padrões da curva de calibração e os MR, sendo que as replicatas das amostras e os materiais de referência foram adicionados aos poços do kit de forma aleatória.

Foram pipetados 100 μ L das soluções padrões da curva de calibração, em duplicata, para os poços A1 e A2 até F1 e F2. Foram pipetados 100 μ L dos extratos de amostras e dos MR para os demais poços restantes da placa, utilizando-se, no máximo, 48 poços por bateria analítica e respeitando os múltiplos de 8 (**Figura 8**).

Figura 8 – Apresentação da placa de ELISA.

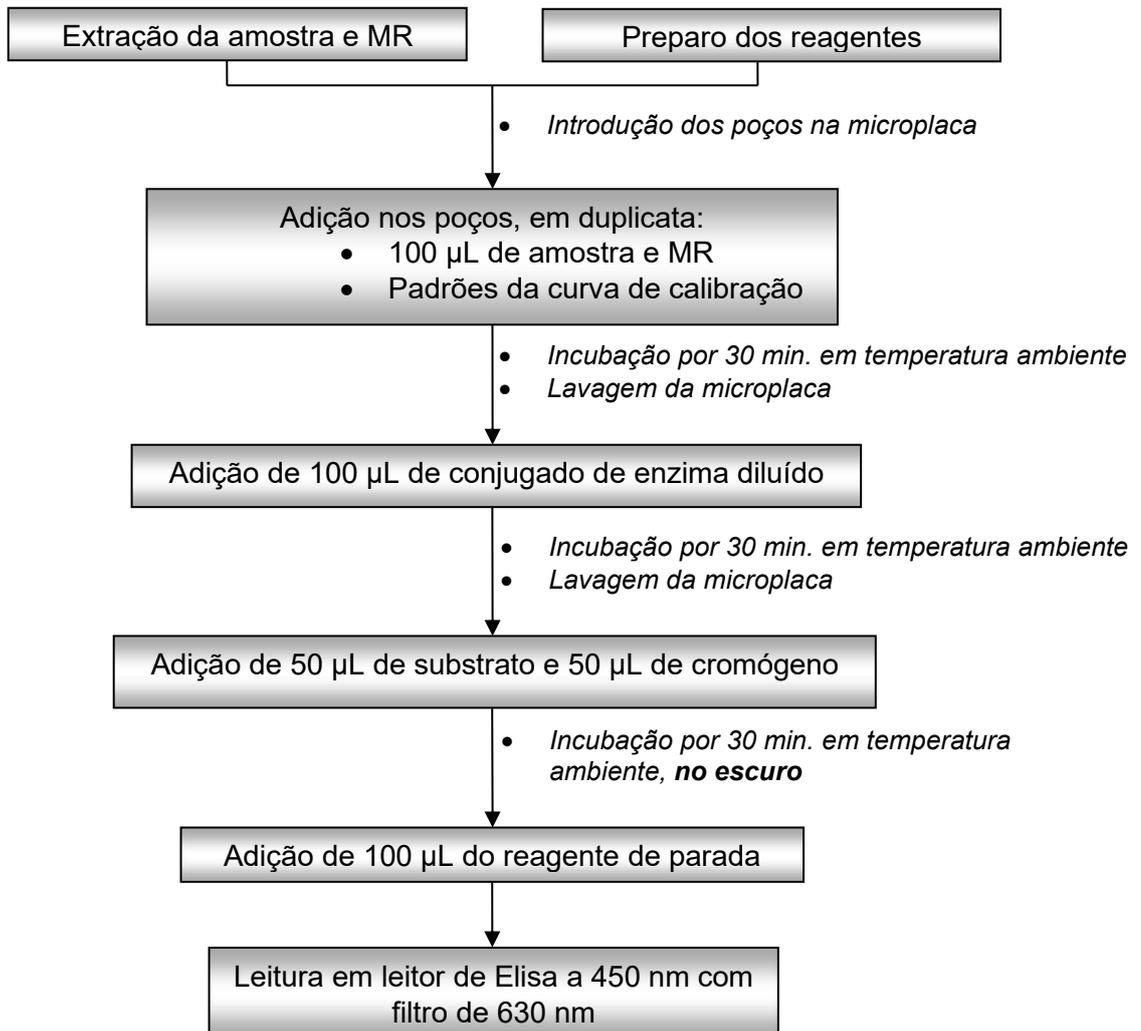


Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Incubou-se a microplaca por 30 minutos. Posteriormente, procedeu-se a lavagem das placas, utilizando-se a lavadora automática de placas de ELISA, com 250 μL de tampão de lavagem, com programação de 3 ciclos, conforme recomendação do fabricante. Em seguida, adicionou-se, com pipeta repetidora, 100 μL do conjugado de enzima diluído em cada poço e incubou-se por 30 min., repetindo-se o processo de lavagem. Adicionou-se, com pipeta repetidora, 50 μL de substrato e 50 μL de cromógeno em cada poço, misturou-se, delicada e manualmente a placa, e incubou-se por 30 min. no escuro. Adicionou-se, com a pipeta repetidora, 100 μL do reagente de parada da reação e misturou-se suave e manualmente. Esta reação apresentou estabilidade por 30 min. após adição do reagente de parada. Mediu-se a absorbância, em leitor de ELISA a 450 nm (com filtro de 630 nm) (**Figura 9**).

Os valores de absorbância obtidos foram utilizados para os cálculos.

Figura 9 – Fluxograma do imunoensaio

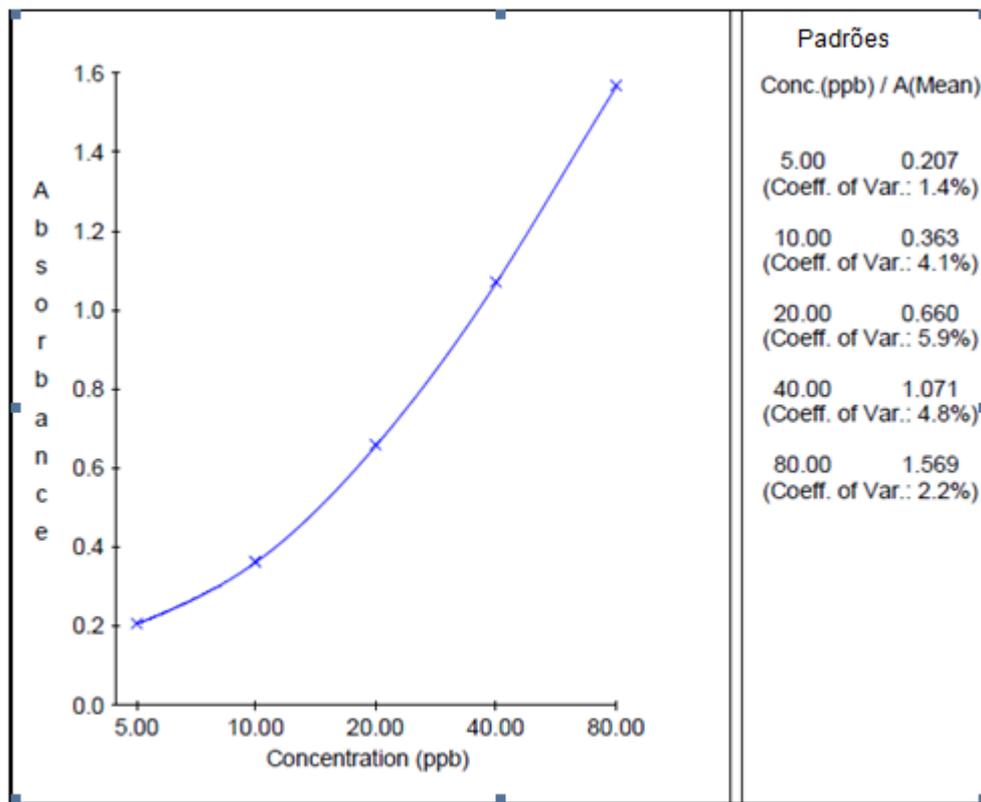


Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

4.4.5 Critério de aceitação da curva

Cada unidade do kit dispõe de um certificado de garantia da qualidade, específico para cada lote no qual são discriminados os valores das concentrações dos padrões e seus respectivos coeficientes de variação e médias de absorbâncias (**Figura 10**).

Figura 10 – Perfil da curva de calibração



Fonte: C:\Ridawin.NET\FOOD\ALLERGEN\Gliadin.met., 2016.

A curva de calibração reporta o teor de gliadina em $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Os valores obtidos na curva de calibração, obtida a cada ensaio, devem ser compatíveis com os valores da curva pré-traçada para o kit em relação ao perfil obtido (certificado de garantia de qualidade) e tratados no programa do *Software RIDA®SOFT Win.net*, versão 1.84.

4.5 Cálculos

Os dados da leitura espectrofotométrica foram plotados no programa do *Software* RIDA@SOFT *Win.net*, versão 1.84, que gera uma curva de calibração estimada pelo método de interpolação por *spline* cúbica. Os dados de leitura das amostras e MR foram lançados na curva de calibração, juntamente com os valores de fator de diluição. Foram obtidos teores de gliadina em $\mu\text{g}/\text{kg}$, os quais foram convertidos em teores de glúten, levando-se em consideração o fator de conversão gliadina/glúten que é 2 e o fator de conversão de μg para mg, conforme **Equação 6**.

$$\text{Glúten em mg/kg} = (C \times 2)/1.000 \quad (\text{Eq. 6})$$

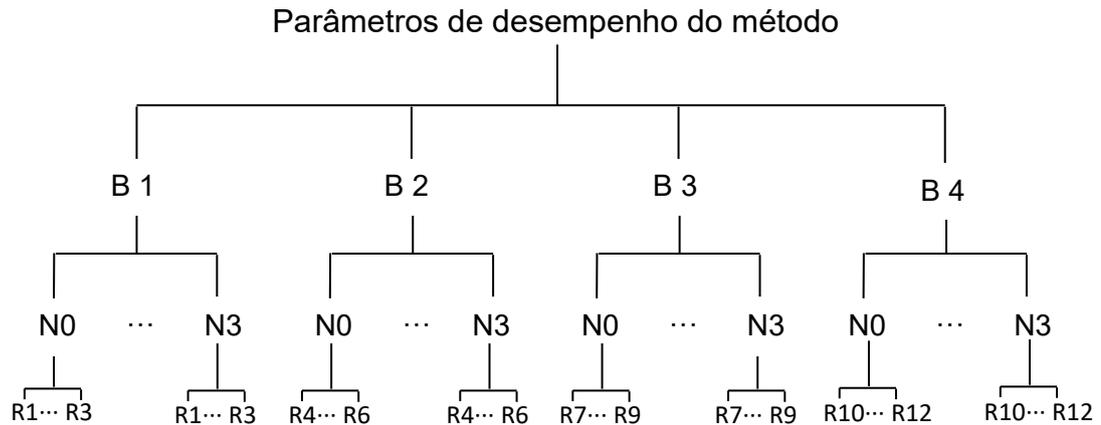
na qual:

(C) = concentração de gliadina proveniente da curva de calibração ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

4.6 Verificação de desempenho do método

Para a verificação de desempenho do método foram analisados os MR com concentração nominal de 23,6 mg de glúten/kg e 41,8 mg de glúten/kg, o branco de glúten e uma amostra de bebida láctea sabor chocolate com teor próximo ao primeiro ponto da curva de calibração, previamente caracterizado no laboratório.

Os MR foram avaliados em replicatas independentes, totalizando 48 ensaios, que foram divididos em quatro bateladas analíticas distintas, com três replicatas cada, envolvendo 2 analistas, e empregando insumos de diferentes lotes, quando possível (**Figura 11**) (EC, 2002; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

Figura 11 – Delineamento experimental para verificação de desempenho do método

Legenda: B: batelada analítica; N: nível de concentração de glúten; N0: branco de glúten; N3: 41,8 mg/kg; R: replicatas.

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

A precisão intermediária foi estudada em condições de repetibilidade (DPR_r) e reprodutibilidade intermediária (DPR_R), conforme proposto por SOUZA (2007) e INMETRO (2016), sendo estimadas por análise de variância e expressas em termos de DPR. Valores dispersos foram investigados pelo teste de Grubbs, ao nível de 95% de confiança, com remoção dos dados discrepantes em até 22,2% do número original de resultados. As premissas relacionadas ao teste de F foram previamente testadas: normalidade (Ryan Joiner) e homoscedasticidade (Brown-Forsythe) dos resíduos (SOUZA, 2007; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

A veracidade (recuperação média percentual) foi estudada para os MR e considerada satisfatória quanto ao atendimento do critério de 80 a 110% para o nível de concentração em questão em mg/kg (INMETRO, 2016; AOAC, 2012b; EC, 2002).

Para a avaliação da precisão, as razões HorRat foram determinadas e consideradas satisfatórias quando o produto da divisão fosse igual ou inferior a 2,0 (HORWITZ; ALBERT, 2006).

Foram considerados como LD e LQ teóricos aqueles informados pelo fabricante (3,0 e 5,0 mg/kg de glúten, respectivamente).

O LQ experimental foi definido como sendo igual à média das determinações da amostra de teor próximo ao primeiro ponto da curva de calibração, (SOUZA *et al.*, 2007) e obtenção de resultados satisfatórios para repetibilidade e precisão intermediária (SOUZA, 2007). O LD experimental foi calculado como sendo o $LQ_{\text{experimental}}/3,3$ (INMETRO, 2016).

4.7 Estimativa da incerteza de medição

Para o cálculo da estimativa da incerteza de medição as fontes de incerteza foram identificadas e inseridas em uma planilha de cálculo em que foram alocadas as fontes com suas descrições, as unidades de medida, o valor de medida, a avaliação do tipo de erro, o valor da incerteza, os graus de liberdade, o divisor, a incerteza padrão, a variância relativa e o percentual de contribuição. Foi estipulado o nível de confiança pretendido e calculados os graus de liberdade efetivos, o fator de abrangência, a incerteza padrão combinada, a incerteza padrão expandida e a incerteza padrão expandida percentual (ELLISON; WILLIAMS, 2012), conforme **Apêndice A**.

Foi determinado que, para os valores de incerteza inseridos relativos aos equipamentos pertencentes ao LQB, seriam utilizados os valores de veracidade descritos no manual do fabricante acrescidos de 1/3 deste valor, pelo fato de não serem equipamentos novos. Para a leitora de ELISA e o pipetador de repetição foi utilizado o somatório do erro e da incerteza declarados nos certificados de calibração.

Foram estimados valores de incerteza de medição para os níveis de concentração dos MR utilizados e da amostra de concentração próxima ao primeiro ponto da curva de calibração.

4.8 Avaliação da rotulagem

A avaliação da rotulagem foi feita por meio de observação visual dos rótulos dos produtos coletados. As declarações “Contém glúten” e “Não contém glúten” foram verificadas quanto à presença e conformidade com a Lei 10.674 de 16 de maio de 2003.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descontaminação do ambiente, embalagens e materiais

Foram obtidos resultados negativos e satisfatórios na verificação da eficácia do processo de descontaminação do ambiente, embalagens das amostras e materiais, nas três bateladas analíticas avaliadas. Esta verificação contribuiu com a confiabilidade dos resultados analíticos, uma vez que evidenciou que as medidas adotadas para evitar a ocorrência de contaminação cruzada durante a execução do ensaio analítico foram eficazes.

5.2 Avaliação de desempenho do método

As curvas traçadas para todas as bateladas analíticas apresentaram similaridade com o perfil da curva padrão, sendo assim consideradas adequadas ao uso. Tendo em vista que a curva de calibração não seguiu um modelo de regressão linear e o modelo polinomial não foi disponibilizado pelo fabricante, avaliações tradicionais de linearidade como as previstas pelo INMETRO não foram aplicáveis (INMETRO, 2016).

Os dados analíticos obtidos para os MR foram, primeiramente, avaliados com base na recomendação do fabricante do kit. Avaliaram-se os dados das concentrações dos MR em relação às faixas estabelecidas para eles, consideraram-se satisfatórios valores de leitura que estivessem compreendidos na faixa de valores reportada pelo fabricante (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Comparação dos teores de glúten dos MR declarados pelo fabricante e obtidos experimentalmente.

Origem dos dados	MR	n	Veracidade (R _m %)	MV (mg/kg)	CV (%)	Faixa de valores (mg/kg)	Faixa de R _m (%)
Fabricante	BG	24	-	ND	-	-	-
	23,6	24	-	23,6	13,5	15,6 – 31,8	66,1 – 134,7
	41,8	24	-	41,8	12,7	30,2 – 58,4	72,2 – 139,7
Experimental	BG	12*	-	ND	-	-	-
	23,6	11*	88,4	20,9	9,2	17,3 – 24,1	73,3 – 102,1
	41,8	11*	97,9	40,9	6,6	37,1 – 45,8	88,8 – 109,6

Legenda: n: número de amostras; * após tratamento de outliers; R_m: recuperação média em percentual; MV: média dos teores de glúten; CV: coeficiente de variação; BG: branco de glúten; ND: não detectado (< 5 mg/kg).

Fonte: adaptado de R-Biopharm – Set of 3 Gliadin Assay Controls. 13-10-14 (pg 6-7) e dados do autor, 2016.

Satisfeitos os critérios do fabricante, o desempenho do método foi avaliado em termos de limite de quantificação, veracidade, precisão sob condições de repetibilidade, precisão intermediária e estimativa da incerteza de medição.

Encontrou-se valores médios de 88,4 e 97,9% de veracidade para os MR de glúten de concentração 23,6 mg/kg e 41,8 mg/kg, respectivamente. Tais valores atenderam aos critérios estabelecidos tanto pela AOAC (2012b) e EC (2002), quanto pelo INMETRO (2016). Observa-se que as faixas de recuperação médias obtidas por meio dos valores mínimo e máximo das determinações do MR, atendem a faixa de 80 – 110% para o valor de maior concentração, mas não para a faixa mínima da menor concentração. Comparando estes valores com os descritos pelo fabricante, percebe-se que foram encontrados valores mais ajustados entre si, os quais foram comprovados pelos valores de CV experimentais menores do que os informados pelo fabricante. Tal fato pode ser justificado pelo fato dos dados informados pelo fabricante serem oriundos de ensaio colaborativo, o que justifica a maior amplitude da faixa de R_m e, conseqüentemente, do CV (AOAC, 2012c).

Não foram encontrados valores dispersos de acordo com teste de *Grubbs*, ao nível de 95% de confiança para a amostra. Para os MR foram excluídos 2 *outliers*, um de cada nível de concentração. Os resíduos foram testados pela estatística de Ryan-Joiner e seguiram a distribuição normal, permitindo o emprego de ANOVA. Os valores estimados de DPR_r, DPR_R e HorRat encontram-se discriminados na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária e HorRat obtidos por imunoenensaio.

Concentração (mg/kg)	n	DPR _r (%)	DPR _R (%)	HorRat _r	HorRat _R
7,1	12	14,9	14,9	1,9	1,3
23,6	11	5,8	9,8	0,9	1,0
41,8	11	6,8	6,8	1,1	0,7

Legenda: n = número de observações após tratamento de outliers pelo teste de Grubbs; DPR_r: desvio padrão relativo de repetibilidade; DPR_R: desvio padrão relativo de precisão intermediária; HorRat: valor observado de DPR_r dividido pelo valor de DPR_r de referência, definido como 2/3 da DPR_R estimada pela equação modificada de Horwitz ou Thompson.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Os valores de HorRat calculados tanto para os dados de repetibilidade (HorRat_r) quanto para os dados de reprodutibilidade parcial (HorRat_R) foram inferiores a 2,0 para todas as concentrações estudadas, indicando que o critério de desempenho foi cumprido e demonstrando a validade da repetibilidade e da reprodutibilidade parcial do método. O método se mostrou exato e preciso em condições de repetibilidade e de reprodutibilidade parcial para as concentrações estudadas a um nível e 95% de confiança, confirmando a sua aplicação como método quantitativo.

Rakita *et al.* (2014) validaram um método de determinação de grupos sulfidrilas livres no glúten de trigo em diferentes condições de tempo e temperatura de incubação e utilizaram o HorRat como critério de aceitação da precisão. Foram encontrados valores de HorRat inferiores a 2,0, de forma similar aos resultados reportados no presente estudo.

O limite de detecção e quantificação experimentais foram de 2,2 e 7,1 mg de glúten/kg, respectivamente. Estes valores foram similares aos informados pelo fabricante (R-BIOPHARM, 2012).

Dentre os estudos pesquisados, todos os que citaram o uso do kit Ridascreen® Gliadin informaram os limites de detecção ou quantificação do fabricante do kit, sem confirmação da adequação ao propósito ou cálculo de valor experimental (CHU; WEN, 2013; CAWTHORN; STEINMAN; WITTHUHN, 2010; DOSTÁLEK *et al.*, 2006; GÉLINAS *et al.*, 2008; GOUVEIA, 2014; LAUREANO, 2010; LÓPEZ *et al.*, 2010; MENA *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2014; PIRES, 2013; SHARMA; PEREIRA; WILLIAMS, 2015; SILVA, 2010; THOMPSON; LEE; GRACE, 2010; THOMPSON; SIMPSON, 2015).

Para os demais métodos empregados por outros autores em seus estudos, foram citados limites de detecção que variaram de 1,0 a 93,0 mg/kg. Tem-se para o imunoenensaio Lab Test um LD de 80 mg/kg (SDEPANIAN *et al.*, 2001), para o kit Transia Gluten Lab Test 20 mg/kg (STORSRUD; YMAN; LENNER, 2003), para citometria de fluxo 10 mg/kg (CAPPARELLI *et al.*, 2005), para cromatografia líquida de alta eficiência 93 mg/kg (MEIRINHO, 2009) e 46,5 mg/kg (PERES *et al.*, 2011), para imunoenensaio por fluorescência 1,2 mg/kg (CHU;WEN, 2013) e para o kit Biokits Gluten Assay 1,0 mg/kg (OLIVEIRA, 2013). Pode-se perceber que houve redução nos valores de LD com o passar dos anos. Porém, dos métodos citados, apenas os estudos com CLAE informaram valores de limite de quantificação.

Dentre os estudos pesquisados, alguns não relataram valores de LD e LQ (ALLMAN *et al.*, 1993; DAHINDEN; BÜREN; LÜTHY, 2001) outros não relataram a realização de validação ou estudo de parâmetros de desempenho (DOSTALÉK *et al.*, 2006; GÉLINAS *et al.*, 2008; LÓPEZ *et al.*, 2010; STORSRUD; YMAN; LENNER, 2003; THOMPSON; SIMPSON, 2015). Pode-se observar que alguns autores citaram a realização de validação de alguns métodos, mas não informaram resultados (AMAYA-GONZÁLES *et al.*, 2011; CAPPARELI *et al.*, 2005; OLEXOVÁ *et al.*, 2006; SEALEY-VOYKSNER *et al.*, 2010; THOMPSON; LEE; GRACE, 2010). Em publicações a partir de 2011, os autores começaram a descrever a avaliação de parâmetros como repetibilidade e reprodutibilidade (CHU; WEN, 2013; MENA *et al.*, 2012; PERES *et al.*, 2011). De todos os estudos pesquisados, Rakita *et al.* (2014) foram os únicos autores a detalhar o processo de validação e calcular a incerteza de medição para o método proposto.

5.3 Estimativa da incerteza de medição

Foram identificadas as fontes de incerteza associadas a cada etapa do método. Os principais fatores que afetaram os resultados na determinação do glúten foram a reprodutibilidade parcial e os equipamentos de medição (balança, pipetadores e leitora de ELISA).

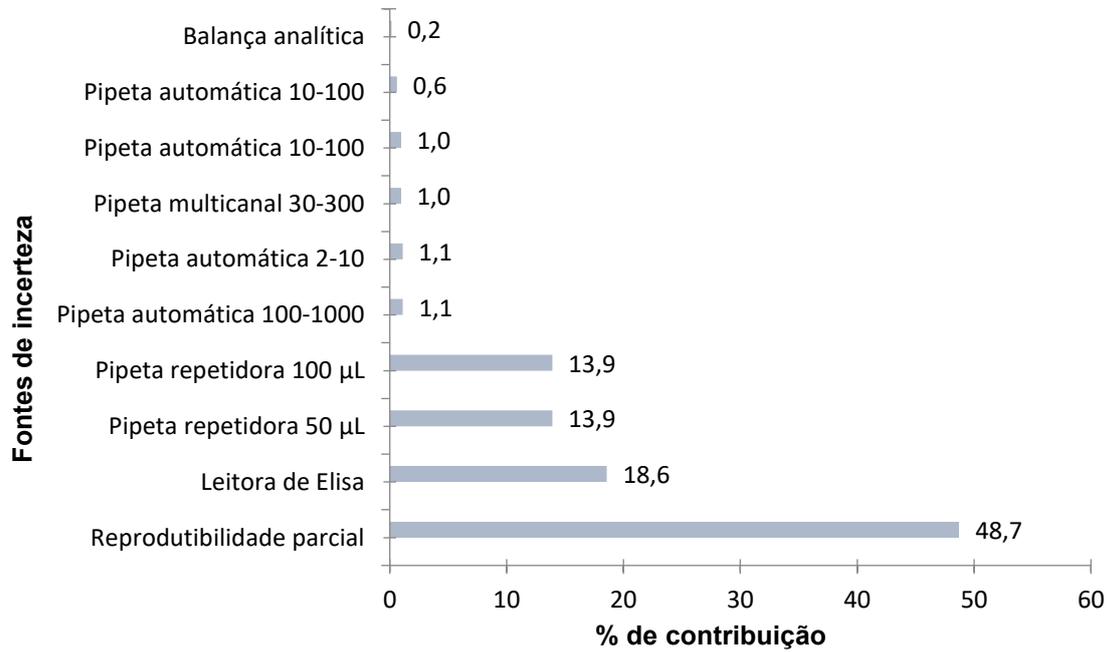
Portanto, os seguintes parâmetros foram envolvidos no cálculo da incerteza de medição:

1. A reprodutibilidade parcial (Repro)
2. Balança analítica – grama (Bal)
3. Pipeta repetidora – 50 μL (PR₅₀)
4. Pipeta repetidora – 100 μL (PR₁₀₀)
5. Pipetador automático 2 – 10 mL (PPA₁)
6. Pipetador automático 10 – 100 μL (PPA₂)
7. Pipetador automático 10 – 100 μL (PPA₃)
8. Pipetador automático 100 – 1000 μL (PPA₄)
9. Leitora de ELISA – ABS (LE)

Os valores de incerteza obtidos foram de 12,04%, 10,15% e 9,30% para a amostra com concentração próxima a 5 mg/kg (primeiro ponto da curva) e para os materiais de referência de 23,6 mg/kg e 41,8 mg/kg, respectivamente, conforme pode ser observado nos **APÊNDICE(s) A, B e C**. Notou-se que os percentuais foram muito similares, independentemente do nível de concentração e foram inferiores ao encontrado por Rakita *et al* (2014) no único estudo de quantificação de glúten onde se estimou a incerteza de medição. Neste estudo, no qual determinou-se a presença de grupos sulfidrilas livres em glúten, por método fotométrico a 412 nm, foi encontrada uma incerteza padrão expandida percentual de 20% com principais contribuições provindas da medida da ABS (53,14%), da construção da curva de calibração (inclinação) (13,28%) e da determinação do teor de glúten úmido (29,38%).

Neste trabalho, pode-se perceber que as fontes de maior impacto foram a reprodutibilidade parcial, a leitora de ELISA e a pipeta repetidora (**Figura 12**).

Figura 12 – Contribuição (%) de cada fonte de incerteza



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

5.4 Monitoramento de alimentos processados quanto a presença ou não de glúten

Foram analisadas 245 amostras quanto à declaração de presença/ausência de glúten no rótulo e seus teores analíticos. Essa informação encontra-se detalhada com total de amostras e marcas por categorias de alimentos, suas respectivas declarações do rótulo e enquadramento do teor de glúten de glúten na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Total de amostras e marcas por categorias de alimentos com suas respectivas declarações do rótulo e enquadramento do teor de glúten.

Categoria de alimento	amostra/marca	Declaração do rótulo			n	Teor de glúten (mg/kg)			
		“Não contém glúten”	“Contém glúten”	Não declara		< 5	5 - < 20	20 - < 80	> 80
Bebida láctea UHT sabor chocolate	14 / 10	8	6	-	9	-	2	3	
Bebida a base de soja com frutas	21 / 7	21	-	-	21	-	-	-	
Biscoito de polvilho	18 / 13	17	1	-	17	-	1	-	
Biscoito sem glúten/integral	18 / 9	18	-	-	18	-	-	-	
Café	15 / 11	15	-	-	15	-	-	-	
Cárneos	17 / 11	17	-	-	17	-	-	-	
Farinha de milho	17 / 16	14	-	3	17	-	-	-	
Fubá	27 / 20	23	2	2	27	-	-	-	
Macarrão sem glúten	11 / 4	11	-	-	11	-	-	-	
Pão de queijo	15 / 12	15	-	-	15	-	-	-	
Preparado em pó	12 / 11	11	1	-	12	-	-	-	
Salgadinho de milho	11 / 9	8	3	-	11	-	-	-	
Sucos e néctares UHT	16 / 10	16	-	-	16	-	-	-	
Tapioca e farinha de mandioca	7 / 5	7	-	-	7	-	-	-	
Temperos prontos	26 / 9	10	16	-	22	2	2	-	
Total	245 / 157	211	29	5	235	2	5	3	

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Das amostras analisadas, 235 (95,9%) apresentaram teor de glúten abaixo de 5 mg/kg, 2 (0,8%) apresentaram teor entre 5 mg/kg e 20 mg/kg, 5 (2,1%) apresentaram teor entre 20 mg/kg e 80 mg/kg e 3 (1,2%) apresentaram teor acima de 80 mg/kg.

Considerando o limite de 20 mg/kg para classificação dos produtos como isentos de glúten, para fins de comparação com dados internacionais, 96,7% das amostras apresentaram teor de glúten abaixo deste valor. Os resultados foram similares aos reportados por Sharma, Pereira e Williams (2015) que encontraram 98,9% de alimentos abaixo deste limite nos Estados Unidos. E, também, próximo aos 95% de alimentos com teor de glúten abaixo de 20 mg/kg e 87% abaixo de 5 mg/kg, dentre os alimentos analisados por Thompson e Simpson (2015).

Os resultados encontrados neste estudo sugeriram uma melhora nas Boas Práticas de Produção das empresas brasileiras desde 2010, visto que o percentual de alimentos com declaração “Não contém glúten” em conformidade com o resultado analítico foi de 99,0%, superior aos percentuais reportados nos anos anteriores. Em estudos cronológicos, observou-se que 87,0% das amostras analisadas por Silva (2010) estavam em conformidade com o especificado no rótulo. Em 2010, Laureano encontrou 71,4% de adequação enquanto Oliveira (2013) observou 75,0%. Em 2014, este percentual aumentou para 78,5% demonstrado no estudo de Gouveia e 83,3% no trabalho de Morais *et al.*

Destaca-se que, no presente estudo, 211 amostras com declaração “Não contém glúten” foram analisadas. Valor este, maior que os trabalhos desenvolvidos anteriormente por Silva (2010) 115 amostras, Laureano (2010) 70 amostras, Oliveira (2013) 60 amostras, Gouveia (2014) 130 amostras e Morais *et al.* (2014) 6 amostras, todos com a mesma declaração.

Ressalta-se, neste estudo, a diversidade de amostras analisadas frente aos estudos brasileiros que, no geral, contemplaram uma menor variedade. PICCOLOTO (2002) estudou produtos de panificação, cerveja, achocolatado, molhos e temperos, salsichas, linguiça e sopas desidratadas. MEIRINHO (2009) analisou papinhas, farinhas, cereais, bolachas e pão. Em 2010, SILVA estudou produtos à base de arroz, milho, mandioca, batata e quinoa e BICUDO avaliou tortilhas doces e salgadas a base de farinha de arroz. OLIVEIRA (2013) estudou feijão cozido enquanto PIRES (2013) estudou biscoitos. Em 2014, GOUVEIA avaliou pão de queijo, biscoito de polvilho, bolos e pão sem glúten e MORAIS *et al.* produtos de batata, arroz, soja e milho.

Em comparação com estudos internacionais, tem-se 16 com um número de amostras variando entre 5 e 100 e quatro estudos com 110 (Storsrud; Yman; Lenner, 2003), 148 (Gélinas *et al*, 2008), 461 (Sharma; Pereira; Williams, 2015) e 158 (Thompson; Simpson, 2015) amostras, sendo que o estudo de Sharma; Pereira; Williams contou com 275 amostras com a declaração “Não contém glúten”.

5.4.1 Alimentos tradicionalmente sem glúten

Os alimentos listados abaixo são tradicionalmente considerados sem glúten, pois, via de regra, não contêm em sua composição trigo, centeio, cevada, aveia e nenhuma de suas estirpes hibridizadas. Estes alimentos são café, bebidas prontas para consumo (bebida de soja e sucos e néctares), derivados de mandioca (biscoito de polvilho, pão de queijo, farinhas para tapioca e farinha de mandioca), derivados de milho (farinhas de milho, fubá e salgadinho de milho), preparados em pó a base de arroz e milho (amidos e pó para cremes), produtos cárneos (hambúrguer, salsicha e mortadela) e temperos prontos em tablete ou pó.

Considerando a natureza dos produtos, independentemente de sua rotulagem quanto a declaração de glúten, tem-se que, todos os demais alimentos analisados apresentaram teores de glúten inferior a 5 mg/kg, com exceção da bebida láctea UHT sabor chocolate, do biscoito de polvilho e do tempero pronto. Um número significativo de amostras com teor de glúten menor que 5 mg/kg também foi encontrado por outros pesquisadores. Thompson; Simpson (2015) encontraram resultado semelhante para aproximadamente 87% dos alimentos pesquisados. Oliveira (2013) declarou um total de 75% dos produtos com teor menor que 5 mg/kg e Pires (2013) reportou 93,3%. Gouveia (2014) e Sharma; Pereira; Williams (2015) encontraram 78,5% e 91,5% das amostras, respectivamente, isentas de glúten, mas tais autores consideraram como isentos os alimentos com teores de glúten abaixo de 20 mg/kg.

Mati; Staruch (2012) pesquisaram o teor de glúten em 16 produtos cárneos e cinco mix de temperos encontrando um produto cárneo com teor de glúten acima de 80 mg/kg e um mix de temperos com teor de 12,2 mg/kg. Campagna *et al*. (2013) pesquisaram 100 amostras de produtos cárneos e encontrou resultado abaixo do LD (1 mg/kg) para todas as amostras, evidenciando a segurança deste tipo de produto para os celíacos. Contudo, estes pesquisadores ressaltaram que a comparação dos dados

obtidos com outros estudos sobre esta matriz é difícil, dada a escassez de trabalhos na literatura abordando produtos de carne contaminados com glúten.

Uma amostra de biscoito de polvilho apresentou teor de glúten de 74 mg/kg e declarava “Contém glúten”. No entanto, curiosamente, não apresentava nenhum ingrediente que fosse fonte de glúten em sua lista de ingredientes. O fato de ter-se encontrado glúten no produto sugere uma possível contaminação cruzada ou a ausência de declaração de algum ingrediente fonte de glúten na lista de ingredientes.

Das amostras de tempero pronto, 16 declaravam conter glúten e, destas, 14 (87,5%) apresentaram teor inferior a 5 mg/kg. Das 10 amostras com declaração “Não contém glúten” duas diferentes marcas apresentaram teores de 16 e 37 mg/kg. Piccoloto (2002) encontrou teores de 0,00259 e 0,00317% de glúten, que correspondem a 25,9 e 31,7 mg de glúten/kg, em caldo de galinha e de carne da mesma marca, de forma similar aos resultados obtidos neste estudo. Em 2010, Laureano avaliou três amostras de pó para caldo de galinha e encontrou teores de glúten abaixo de 5 mg/kg para todas as amostras. Em 2012, Mati e Staruch pesquisaram o teor de glúten em produtos cárneos e avaliaram o teor de glúten em seis misturas de especiarias e temperos utilizados nos preparos destes cárneos, encontrando teor de glúten acima de 10 mg/kg em apenas uma amostra. Há poucos estudos envolvendo os temperos prontos, tipo caldo em tablete, o que dificulta uma avaliação mais ampla deste tipo de produto. Considerando-se o teor de glúten neste tipo de alimento, o peso de sua porção e que o mesmo é utilizado dissolvido em quantidades consideráveis de preparações alimentares, pode-se estimar um consumo de glúten muito baixo, mesmo que de forma inadvertida. Supondo um teor de glúten de 37,0 mg/kg que foi o maior teor encontrado, para que uma pessoa ingerisse 10 mg de glúten seria necessário o consumo de 270,2 g de tempero pronto, correspondendo a 28,4 tabletes (considerando a massa da maioria das marcas com 9,5 g). Em estudo realizado por Catassi *et al.* (2007), em indivíduos com consumo diário de 0, 10 ou 50 mg de glúten, foi observada significativa variabilidade na sensibilidade ao glúten. Porém, entre os indivíduos que consumiram 50 mg por dia, foram verificados importantes danos na mucosa intestinal. Quando pesquisadas informações sobre consumo de até 10 mg por dia, observou-se que este consumo é improvável de causar alterações histológicas significantes. Contudo, o limite tolerável de glúten varia entre os portadores da DC e as evidências disponíveis, até então, não permitem a admissão de um valor como definitivo (AKOBENG; THOMAS, 2008).

5.4.2 Alimentos modificados para celíacos

Nesta categoria pode-se incluir o macarrão sem glúten e biscoitos sem glúten cuja formulação é alterada em comparação à tradicional. Para todas as 26 amostras (15 de biscoitos e 11 de macarrões) o teor de glúten foi inferior a 5 mg/kg.

Dentre os estudos que pesquisaram amostras de biscoito com declaração “Não contém glúten”, comparou-se o número bruto de amostras em que foi detectado glúten ao invés dos valores percentuais devido a grande diferença entre o número de amostras avaliadas em cada estudo. Meirinho (2009) e Peres *et al.* (2011) não detectaram glúten em nenhuma amostra. Abreu *et al.* (2006), López *et al.* (2010), Olexová *et al.* (2006) e Pires (2013) encontraram glúten acima do LD em uma amostra de cada estudo. Laureano e Silva (2010) encontraram glúten acima do LD, 4 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente, em quatro amostras cada. Avaliando o decréscimo dos números de amostras com detecção de glúten no passar dos anos, percebe-se uma melhoria no perfil dos produtos, visto que de quatro amostras em 2010 os números caíram para uma amostra em 2013 e para zero no presente estudo.

Dos estudos que pesquisaram amostras de macarrão com declaração “Não contém glúten”, Silva (2010) encontrou glúten acima do LD em cinco amostras, Laureano (2010) e Sharma; Pereira; Williams (2015) reportaram glúten acima do LD em uma amostra de cada estudo. Notou-se pelo decréscimo dos números de amostra com contaminação a melhora dos produtos ofertados e das Boas Práticas de Produção das indústrias culminando em zero amostras no presente estudo.

5.4.3 Rotulagem

Para análise de rotulagem as declarações “contém glúten” e “não contém glúten” foram confrontados os resultados analíticos da determinação de glúten e a lista de ingredientes dos produtos. Também foi avaliada a presença de expressões não previstas na Lei 10.674/2003 (BRASIL, 2003).

Das 245 amostras avaliadas, 86,1% (211) declaravam “Não contém glúten”, 11,8% (29) declaravam “Contém glúten” e 2,1% (5) não declaravam informação a respeito da presença ou não de glúten no rótulo, contrariando a determinação da Lei. Segundo Sharma; Pereira; Williams (2015) é importante avaliar o teor de glúten nos alimentos para verificação da conformidade da rotulagem e segurança do consumidor.

Dentre as 211 amostras com declaração “Não contém glúten”, 209 (99,0%) apresentaram conformidade da declaração do rótulo com a lista de ingredientes e o teor analítico de glúten (**Tabela 11**). Foram verificadas não conformidades em duas amostras de temperos prontos, com teores de glúten de 16 e 37 mg/kg, por estarem com a declaração do rótulo e da lista de ingredientes contraditórias ao teor analítico.

Observou-se que a legislação brasileira prevê unicamente o uso das expressões “Contém glúten” e “Não contém glúten” (BRASIL, 2003). Para os grupos de alimentos: biscoito de polvilho, biscoito sem glúten, macarrão sem glúten e tapioca foram verificadas expressões em desacordo, tais como: “Sem glúten”, “Zero glúten” e “Apto para celíacos” em 26 (48%) de 54 amostras. Não existe uma harmonização internacional entre as legislações que tratam da rotulagem a respeito do glúten e, conseqüentemente, do uso de termos tais como o “*Gluten-free*”, amplamente utilizado internacionalmente. Conseqüentemente, ocorrem interpretações errôneas de sua utilização pelas indústrias brasileiras que trazem as expressões “Sem glúten” e “Zero glúten”, em destaque, como forma de diferenciar seus produtos em relação ao convencional e atrair o consumidor.

Tabela 11 – Número de amostras analisadas por categoria, declaração do rótulo, presença de ingrediente fonte de glúten e teor analítico de glúten.

Categoria	Número de amostras									
	Amostras com declaração “Não contém glúten”					Amostras com declaração “Contém glúten”				
	Total	Presença de ingr. fonte	n para glúten < 5 mg/kg	n para glúten ≥ 5 mg/kg	Total	Presença de ingr. fonte	n para glúten < 5 mg/kg	n para glúten ≥ 5 mg/kg		
Bebida láctea UHT sabor chocolate	8	-	8	-	6	5*	1	5		
Bebida a base de soja com frutas	21	-	21	-	-	-	-	-		
Biscoito de polvilho	17	-	17	-	1	-	-	1		
Biscoito sem glúten/integral	18	-	18	-	-	-	-	-		
Café	15	-	15	-	-	-	-	-		
Cárneos	17	-	17	-	-	-	-	-		
Farinha de milho	14	-	14	-	-	-	-	-		
Fubá	23	-	23	-	2	-*	2	-		
Macarrão sem glúten	11	-	11	-	-	-	-	-		
Pão de queijo	15	-	15	-	-	-	-	-		
Preparado em pó	11	-	11	-	1	-	1	-		
Salgadinho de milho	8	-	8	-	3	-*	3	-		
Sucos e néctares UHT	16	-	16	-	-	-	-	-		
Tapioca e farinha de mandioca	7	-	7	-	-	-	-	-		
Temperos prontos	10	-	8	2	16	-	14	2		
Total	211	-	209	2	29	5	21	8		

Legenda: ingr. = ingrediente, * = declaração de advertência.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Dentre os grupos de alimentos que declaravam “contém glúten” (bebida láctea UHT sabor chocolate, biscoito de polvilho, fubá, preparado em pó, salgadinho de milho e tempero pronto) apenas a bebida láctea UHT sabor chocolate relacionava o extrato de malte (ingrediente fonte de glúten) na lista de ingredientes do produto, ficando a declaração dos demais alimentos em desacordo, e conseqüentemente cabendo aos fabricantes uma justificativa junto a VISA o motivo de tal declaração.

Dentre os 29 produtos com declaração “contém glúten”, no rótulo de cinco (17,2%) havia advertências como “pode conter traços de aveia” (1 – bebida láctea UHT sabor chocolate), “produzido em local com alimentos com glúten” (1 – fubá), “pode conter traços de trigo” (2 – salgadinho de milho) e “produzido em equipamentos que processam produtos com glúten” (1 – salgadinho de milho). Em todos os cinco produtos o teor de glúten foi inferior a 5 mg/kg. De forma similar, Sharma; Pereira; Williams (2015) encontraram 28,5% de produtos com advertência.

Das seis amostras de bebida láctea UHT sabor chocolate, com declaração “*Contém glúten*” uma reportava a advertência “Pode conter traços de aveia”, porém, seu teor analítico de glúten foi inferior a 5 mg/kg. Como o próprio fabricante do kit informa, este não se aplica a análise de aveia. Então, não é possível inferir se a não detecção de glúten é devido à ausência de contaminação ou a incapacidade do kit em detectar avenina.

Dentre as 17 amostras de biscoito de polvilho, tradicionalmente conhecido por não conter glúten, curiosamente, uma amostra declarava “*Contém glúten*”, mas não apresentava nenhum ingrediente fonte em sua lista de ingredientes e apresentou um teor de 74 mg/kg demonstrando inconsistência entre a declaração de presença de glúten, a lista de ingredientes e o resultado analítico, embora não estivesse em desacordo com a Lei. O teor de glúten encontrado na análise sugere contaminação cruzada no produto. Conforme Gélinas *et al* (2008) e Sdepanian *et al* (2001) produtos isentos de glúten tem como principais problemas as matérias primas contaminadas e as etapas de processamento onde pode ocorrer contaminação cruzada, comprometendo a qualidade dos produtos elaborados a partir delas. Esta mesma hipótese de contaminação cruzada pode ser utilizada para justificar os teores de glúten encontrados nas amostras de temperos prontos que apresentaram resultado em desacordo com a declaração do rótulo.

6. CONCLUSÕES

De forma geral os produtos analisados apresentaram teor de glúten abaixo do LQ (95,9%), demonstrando que estes produtos estavam adequados ao consumo por celíacos. Poucas amostras (2,1%) não declaravam informação a respeito da presença ou não de glúten no rótulo, contrariando a determinação da Lei 10.674 de 2003.

Dentre as amostras com declaração “Não contém glúten”, 99,0% apresentaram conformidade da declaração do rótulo com a lista de ingredientes e o teor analítico de glúten e 1,0% estavam em desacordo quanto ao teor analítico.

Das amostras com declaração “contém glúten”, 72,4% estavam em desacordo, pois não foi possível quantificar o glúten e não apresentavam ingrediente fonte configurando declarações preventivas pela indústria. Além disso, algumas amostras traziam em seus rótulos advertências tais como: “pode conter traços de aveia”, “produzido em local com alimentos com glúten”, “pode conter traços de trigo” e “produzido em equipamentos que processam produtos com glúten”. Em 27,6% o glúten foi quantificado, estando em conformidade tanto com a lista de ingredientes quanto com a declaração.

A avaliação intralaboratorial dos parâmetros de desempenho (limite de quantificação, precisão em condições de repetibilidade, veracidade, precisão intermediária e estimativa da incerteza de medição) do método recomendado pela AOAC (ELISA R5 – Kit RIDASCREEN® Gliadin R7001 da R-Biopharm) para determinação de glúten indicou que o referido kit foi adequado aos propósitos de uso.

Tendo em vista a criticidade da declaração do teor de glúten nos alimentos para os portadores de DC, o monitoramento dos alimentos perante a Lei 10.674/2003 se faz necessário e constitui uma estratégia de saúde pública para tornar os rótulos instrumentos de informação confiável e facilitar a escolha de alimentos adequados para esta população em específico, garantindo assim sua segurança alimentar.

7. PERSPECTIVAS/ CONSIDERAÇÕES/ SUGESTÕES

SILVA (2010) alegou não haver um sistema de vigilância em vigor para inspeção e controle do teor de glúten em alimentos. Desde março de 2015 até setembro de 2016 foram analisadas 245 amostras pelo sistema de VISA a qual a FUNED é integrante e existe a intenção de que essa análise seja mantida no escopo do LQB e ampliada para mais LACENs no país.

Existe a necessidade de se fiscalizar o cumprimento da Resolução RDC nº 26/2015 que trata da declaração de alérgenos onde estão previstos “Trigo, centeio, cevada, aveia e suas estirpes hibridizadas” que podem ter sua presença identificada de forma indireta pela determinação de glúten, com exceção da aveia.

A determinação do teor de glúten em produtos fermentados por meio do uso de kit ELISA competitivo também é uma demanda de ampliação de escopo do LQB. Além da pesquisa de outros métodos, principalmente para aplicação em linha de produção, como biossensores.

Também se faz necessária a avaliação da degradação do glúten em alimentos submetidos a diferentes processamentos. Conforme estudado por STEPNIAK *et al.* (2006) os alimentos comerciais geralmente têm apenas hidrólise parcial e, quando as proteínas são exaustivamente hidrolisadas, a toxicidade para os pacientes celíacos dos peptídeos gerados geralmente desaparece.

Na realização deste estudo houve dificuldade para aquisição de MRC de glúten por indisponibilidade no mercado e temos como perspectiva o isolamento, a purificação e a caracterização deste material, além da ampliação da realização desta análise por meio de treinamento de outros LACENs e uma posterior realização de ensaio interlaboratorial, mesmo sabendo das dificuldades. Segundo relatado por ECKERT *et al.* (2006) que preparou e caracterizou um material que foi submetido ao Instituto de Materiais e Medições de Referência (IRMM) da Comissão Europeia - Centro Comum de Investigação como material candidato a um MRC para gliadina, não há ainda publicação do seu aceite.

8. PUBLICAÇÕES

ABBOTT, M. *et al.* Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. **Journal of AOAC International**, v.93, p. 442–450, 2010. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20480889/>. Acesso em: 25 set. 2015.

ABREU, R. W. *et al.* Detecção de glúten em alimentos por meio de ELISA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 65(3): 176-180, 2006. Disponível em chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial65_3_completa/1085.pdf. Acesso em: 29 ago. 2015.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos**. Desenvolvido por ANVISA, 2016. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/programa/index.htm#>>. Acesso em: 2 de abr.2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação aos consumidores**: educação para o consumo saudável. Brasília: Athalaia, 2001. 45 p.

AKOBENG, A. K.; THOMAS, A. G. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**. v.27, p.1044-1052, 2008.

ALENCAR, M. L. *et al.* Prevalence of celiac disease among blood donors in SÃO PAULO – the most populated city in Brazil. **Clinics**. 67(9):1013-1018, 2012.

ALLMANN, M., *et al.* Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food - Detection of wheat contamination in non-wheat food products. **Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und-Forschung**, 196:248-251, 1993.

ALLRED, L. K.; PARK, E. S. EZ Gluten for the qualitative detection of gluten in foods, beverages, and environmental surfaces. **Journal of AOAC International**, 95, 1106–1117, 2012.

ALMEIDA, R. C. *et al.* Does Celiac Disease Occur in Afro-Derived Brazilian Populations? **American Journal of Human Biology** 00:000–000, 2012.

AMAYA-GONZALES, S. *et al.* Amperometric Quantification of Gluten in Food Samples Using an ELISA Competitive Assay and Flow Injection Analysis. **Electroanalysis**, 23 (1), 108 – 114, 2011.

AMAYA-GONZALES, S. *et al.* Sensitive gluten determination in gluten-free foods by an electrochemical aptamer-based assay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 407:6021–6029, 2015.

American Gastroenterological Association - AGA. American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Celiac Sprue. **Gastroenterology**, 120:1522–1525, 2001.

ARAÚJO, H. M. C. *et al.* Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. **Revista de Nutrição**, São Paulo, v.23, n.3, p.467-474, maio/jun. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732010000300014&script=sci_arttext>. Acesso em: 18 ago. 2015.

ARRANZ, E. *et al.* **Advances in the understanding of gluten related pathology and the evolution of gluten-free foods**. 1. ed. Barcelona: Omnia Science, 2015. 714p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT. NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

ASSOCIAÇÃO DOS CELÍACOS DO BRASIL - SEÇÃO MINAS GERAIS - ACELBRA-MG. 1997. Disponível em: <<http://www.acebbramg.com.br/?q=node/21>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of the AOAC International**. Gliadin as a Measure of Gluten in Foods Containing Wheat, Rye, and Barley. Enzyme Immunoassay Method Based on a Specific Monoclonal Antibody to the Potentially Celiac Toxic Amino Acid prolamine Sequences. 19th ed. Maryland: AOAC, 2012a.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Maryland: AOAC, 2012b.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Appendix M: Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. Maryland: AOAC, 2012c.

AUSTRALIA. **Australia New Zealand Food Standards Code** – Standard 1.2.3 – Information requirements – Warning statements, advisory statements and declaration. Disponível em: <https://www.legislation.gov.au/Details/F2016C00481>. Acesso em: 23 nov. 2016.

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

BICUDO, Milene Oliveira Pereira. **Avaliação da presença de glúten em produtos panificados para celíacos** - estudo de caso. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília: Senado Federal, Centro Gráfico, 1988. 292 p.

BRASIL. 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.

BRASIL. Lei nº 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**, Brasília, 19 set. 1990b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 8.543, de 23 de dezembro de 1992. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 de dez. 1992.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999: Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial**, Brasília, 27 janeiro 1999. p.1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 40, de 8 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 fev. 2002.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 maio 2003. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/sileg/integras/440852.pdf>>. Acesso em: 2 abr. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 2 de julho de 2015. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 3 jul. 2015.

BRASNKI, D.; TRONCONE, R. Celiac disease: a reappraisal. **J Pediatr**. 1998, 133:181-7.

BUTT, M. S., *et al.* Oat: unique among the cereals. **European Journal of Nutrition**, v.47, no. 2, pp. 68–79, 2008.

CAMPAGNA, M.C., *et al.* Monitoring plan for the detection of gluten not declared on labels in meat preparations: preliminary results. **Italian Journal of Food Safety**, 2 (15), 47-48, 2013.

CANADA. Regulations amending the food and drug regulations (1220- enhanced labeling for food allergen and gluten sources and added sulfites). *Canada Gazette* 145 (4), 324–370, 2011. Disponível em: < <http://www.gazette.gc.ca/rp-pr/p2/2011/2011-02-16/html/sor-dors28-eng.html> >. Acesso em: 14 nov. 2015.

CAPPARELLI, R., *et al.* Quantification of Gliadin Levels to the Picogram Level by Flow Cytometry. **Cytometry Part A** 63A:108–113, 2005.

CATASSI C. El mapa mundial de La enfermedad celíaca. **Acta Gastroenterol Latinoam**, 35: 46-55, 2005.

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

CATASSI, C.; *et al.* Non-Celiac Gluten sensitivity: the new frontier of gluten related disorders. **Nutrients**; 5: 3839-3853, 2013 [PMID: 24077239 DOI: 10.3390/nu5103839].

CAWTHORN, D. M.; STEINMAN, H. A.; WITTHUHN, R. C. Wheat and gluten in South African food products. **Food and Agricultural Immunology**, v.21, n 2, June 2010, 91-102.

CESINO, Jamille Martinello. **Adesão à dieta isenta de glúten por celíacos do sul catarinense**. 2010. Monografia (Bacharelado em Nutrição) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Rio Grande do Sul, 2010. Disponível em: < <http://repositorio.unesc.net/handle/1/133>> Acesso em: 15 ago.2015.

CHU, P. T., WEN, H. W. Sensitive detection and quantification of gliadin contamination in gluten-free food with immunomagnetic beads based liposomal fluorescence immunoassay. **Analytica Chimica Acta** 787 (2013) 246– 253.

CICLITIRA P. J., KING A. L., FRASER J. S. 2001. AGA technical review on celiac sprue. American Gastroenterological Association. **Gastroenterology** 120:1526–1540.

CICLITIRA, P. J.; ELLIS, H. J. Determination of gluten content of foods. **Panminerva Med**. 1991; 33:75–82.

CODEX ALIMENTARIUS. Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten codex stan 118-1979 Adopted in 1979. Amendment: 1983 and 2015. Revision: 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/>. Acesso em: 2 de nov. 2015.

CONVIVIR, FUNDACION DE INTOLERANCIA AL GLUTEN. Certificación. Disponível em: < <http://www.fundacionconvivir.cl/certificacion.html#logotipo> >. Acesso em: 1 de set. 2016.

COTON T., *et al.* Celiac disease: special features in Africa. Description of 8 cases in Djibouti. **Med Trop**, 68:144–148, 2008.

CREVEL R. W., *et al.* Development and evolution of risk assessment for food allergens. **Food Chem Toxicol.**, 2014; 67C:262–276.

CZAJA, T., MAZUREK, S., SZOSTAK, R. Quantification of gluten in wheat flour by FT-Raman spectroscopy, **Food Chemistry**, (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.108>

DAHINDEN, I.; BÜREN, M.V.; LUTHY, J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. **European Food Research and Technology**, 2001, 212 :228–233.

DAY, L., *et al.* Wheat-gluten uses and industry needs. **Trends Food Sci. Technol.**, 2006, 17, 82–90.

DEBNATH J., MARTIN A., GOWDA L.R. A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications for gluten-free labelling. **Food Research International** 42, 782–787, 2009.

DENERY-PAPINI, S., NICOLAS, Y., POPINEAU, Y. Efficiency and limitations of immunochemical assays for the testing of gluten free foods. **Journal of Cereal Science**, 1999, 30, 121–131.

DEWAR D. H., CICLITIRA P. J. Clinical features and diagnosis of celiac disease. **Gastroenterology**, 2005; 128 (4 Suppl 1):S19-S24.

DIAS, F. F. G.; PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Avaliação da rotulagem nutricional obrigatória em embalagens segundo o modelo padrão da ANVISA. **Revista Analytica**. n. 34, p. 56 – 67, 2008.

DIAZ-AMIGO, C., POPPING, B. Gluten and gluten-free: issues and considerations of labeling regulations, detection methods, and assay validation. **Journal of AOAC International**. v.95, n.2, p.337-348, 2012.

DOSTÁLEK, P.; *et al* Immunochemical determination of gluten in malts and beers. **Food Additives and Contaminants**, November 2006; 23(11): 1074–1078.

DOSTÁLEK, P., *et al.* Determination of gluten in glucose syrups. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2009, 22, 762–765.

EC. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. C (2002) 3044. COMMUNITY, E.: **Official Journal of the European Union** L 221, 17/08/2002 P. 0008 - 0036. 2002/657/EC: 36 p. 2002.

EC. No 41/2009. COMMISSION REGULATION. **Official Journal of the European Union** Of 20 January 2009 concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten.

ECKERT *et al.* Towards a new gliadin reference material–isolation and characterisation. **Journal of Cereal Science**, 2006, 43, 331–341.

ELLI L., *et al.* Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. **World J Gastroenterol**, 2015, 21(23): 7110-7119 DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i23.7110>. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i23/7110.htm>>. Acesso em: 10 julho. 2016.

ELLIS, H.J.; FREEDMAN, A.R.; CICLITIRA, P.J. Detection and estimation of the barley prolamin content of beer and malt to assess their suitability for patients with coeliac disease. **Clinica Chimica Acta**. 1990. 189:123–130.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. Eurachem/CITAC guide: **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, Third edition, (2012) ISBN 978-0-948926-30-3. Disponível em: www.eurachem.org." Acessado em: 13, jul 2016.

FASANO A., *et al.* Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States. **Arch Intern Med**. 2003; 163: 286-92.

FASANO A., *et al.* Nonceliac gluten sensitivity. **Gastroenterology**. 2015;148(6):1195-204.

FASANO, A. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. **Physiol Rev**. 2011, 1:91.

Federação Nacional das Associações de Celíacos do Brasil – FENACELBRA. **Guia orientador para celíacos**. Almir Correa Moraes *et al.* São Paulo: Escola Nacional de Defesa do Consumidor, Ministério da Justiça, 2010. 48p.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**. Tradução Adriano Brandelli, 4ª Ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERREIRA, A. B.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Legislação brasileira referente à rotulagem nutricional de alimentos. São Paulo, **Revista de Nutrição**, v.20, n.1, p.1-11 jan/fev. 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732007000100009&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 08 ago. 2014.

Fonte: http://www.leinco.com/sandwich_elisa (figura princípio do método).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for Industry: Gluten-Free Labeling of Foods**. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/UCM402559.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2016.

FREEDMAN A. R., *et al.* Detection of wheat gliadin contamination of gluten-free foods by a monoclonal antibody dot immunobinding assay. **Clin Chim Acta** 1987; 166 (2-3):323-328.

FUNED. Fundação Ezequiel Dias. **MANUAL DE COLETA DE AMOSTRAS**. Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2011/07/pdf-manual-sga-sumario.pdf>>. Acesso em: 10 julho. 2016.

GANDOLFI L., *et al.* Prevalence of Celiac Disease Among Blood Donors in Brazil. **Am J Gastroenterol** 2000; 95:689-692.

GÉLINAS, P.; *et al.* Gluten contamination of cereal foods in Canadá. **International Journal of Food Science and Technology** 2008, 43, 1245–1252.

GODINHO N. M. O. *et al.* Regional patterns of genetic admixture in South America. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series 1** (2008) 329–330

GOESAERT, H. *et al.* Wheat flour constituents: how they impact Bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**. 16. 2005. 12–30.

GOUVEIA, Priscila Farage de. **Avaliação de contaminação por glúten em alimentos isentos de glúten comercializados em panificadoras**. 2014. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2014. Disponível em chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfefndmkaj/https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/16161/1/2014_PriscilaFarageGouveia.pdf. Acesso em: 29 set. 2015.

GREEN, P. H. R.; *et al.* Characteristics of adult celiac disease in the USA: Results of a national survey. **Am J Gastroenterol**. 2001; 96:126-131

GREEN, P. H. R.; CELLIER C. Celiac disease. **N Engl J Med.**, 2007; 357:1731-43.

HARASZI *et al.* Analytical Methods for Detection of Gluten in Food—Method Developments in Support of Food Labeling Legislation. **Journal of AOAC International** v.94, Nº. 4, 2011.

HERNANDO, A., *et al.* Measurement of wheat gluten and barley hordeins in contaminated oats from Europe, the United States and Canada by Sandwich R5 ELISA. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.20, no. 6, pp. 545–554, 2008.

HISCHENHUBER, C., *et al.* Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease (2006) *Alimen. Pharm. Therap.* 23, 559–575, 2006.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance whith to repect to precision. **Journal of AOAC International**, v.89, nº 4, 2006. A141.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. DOQ-CGCRE-008 – **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, rev. 05, ago. 2016.

INTERNATIONAL GRAINS COUNCIL – IGC. **Five-year global supply and demand projections**. England. 2015. P 65.

JANATUINEN, E.K. *et al.* A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. **N Engl J Med**. 1995; 333:1033-1037.

KOERNER, T., *et al* (2011). Gluten contamination in the Canadian commercial oat supply. **Food Additives and Contaminants Part A – Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, 28, 705–710.

KOERNER, T. B., *et al.* (2013). Gluten contamination of naturally gluten-free flours and starches used by Canadians with celiac disease. **Food Additives and Contaminants Part A – Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, 30, 2017–2021.

LA VIEILLE, S. *et al.* Celiac Disease and Gluten-Free Oats: A Canadian Position Based on a Literature Review. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 2016. 10.

LAUREANO, Álvaro Macedo. **Análise da presença de glúten em alimentos rotulados como livre de glúten através de ensaio imunoenzimático e de fitas imunocromatográficas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências em Gastroenterologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/87304>. Acesso em: 29 ago. 2016.

LEONARD, M. M.; VASAGAR, B. US perspective on gluten-related diseases. **Clin Exp Gastroenterol**. 2014; 7:25-37.

LIMA T. A. S.; MODERNELL K. G. Gerência de Inspeção e Controle de Riscos de Alimentos (GICRA). ANVISA. Brasília, 2009. Disponível em: <https://www.google.com.br/?gws_rd=ssl#q=ger%C3%A2ncia+de+inspe%C3%A7%C3%A3o+e+controle+de+riscos+de+alimentos+-+gicra>. Acesso em: 2 de abr.2015.

LÓPEZ, L. B.; *et al.* Gliadins determination in food elaborated with Amaranth, Quinoa and/or Chia. **Revista Chilena de Nutricion**, v.37 (1), 2010.

LUDVIGSSON, J. F. *et al.* The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. **National Institutes of Health**. Gut. 2013 January; 62(1): 43–52. doi:10.1136/gutjnl-2011-301346.

MAGNUSSON, B.; ORNEMARK, U. (Eds.) **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2. ed. 2014. ISBN 978-91-87461-59-0. Disponível em: <www.eurachem.org>. Acesso em: 15 ago. 2016.

MANFREDI, A., *et al.* Multiplex liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the detection of wheat, oat, barley and rye prolamins towards the assessment of gluten-free product safety. **Analytica Chimica Acta**, 895, 62-70, 2015.

MATI M., STARUCH, L. Monitoring of a gluten content in selected meat products from three biggest meat producers in Slovakia. **Potravinarstvo**, v.6, 2012, no. 1, p. 30-33.

MEIRINHO, Sofia Gabriel. **Aplicação de um sistema de multi-sensores para a detecção de gliadinas**: discriminação semi-quantitativa entre alimentos com glúten e sem glúten. 2009. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) - Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2009. Disponível em chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/2537/1/Meirinho_Sofia%20G.pdf. Acesso em: 20 jul. 2016.

MENA, M.C., et al. Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody. **Talanta** 91 (2012) 33– 40.

MINAS GERAIS, Desenvolvido pela Secretaria de Estado da Saúde. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br/component/gmg/page/474-gerencia-de-vigilancia-sanitaria-de-alimentos-sesmg>>. Acesso em: 10 julho, 2016.

MINAS GERAIS. Lei nº 13.317, de 24 de setembro de 1999. **Código de Saúde do Estado de Minas Gerais**. Minas Gerais, Belo Horizonte, 24 set. 1999. p.51.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Política Agrícola Brasileira para a Triticultura e demais Culturas de Inverno**, Brasília, DF, 2012. p.60.

MORAIS C. M. Q. J., et al. Avaliação das informações referentes à presença ou não de glúten em alguns alimentos industrializados. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 2014; 73(3):259-63.

MORÓN et al. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 2008; 87:405–14.

MUJICO, J. R., et al. (2011). A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients. **Food Chemistry**, 128, 795–801.

MURARO et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Protecting consumers with food allergies: understanding food consumption, meeting regulations and identifying unmet needs. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 69 (2014) 1464–1472.

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

OLIVEIRA, Odeth Maria Vieira. **Avaliação da presença de glúten em feijão servido em restaurante de auto-serviço: um problema para os portadores de doença celíaca**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2013. Disponível em chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13375/1/2013_OdethMariaVieiraOliveira.pdf. Acesso em: 20 out. 2016.

PERES, A. M., et al. An electronic tongue for gliadins semi-quantitative detection in foodstuffs. **Talanta** 83 (2011) 857–864.

PETERSON, P. M. Grasses: family Poaceae. In: KRUPNICK, G.A. & KRESS, W. J. **Plant conservartion: A natural history approach**. Chicago: University of Chicago Press. 2005. p 104-108.

PICCOLOTO, Fabiana M. Bertoni Bonetti. **Determinação do teor de glúten por ensaio imunoenzimático em alimentos industrializados**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2002. Disponível em <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/253131>. Acesso em: 23 out. 2016.

PIRES, Bruna Amatto Duarte. **Análise Qualitativa de glúten em alimentos: métodos imunquímicos e moleculares**. 2013. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2013. Disponível em <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/11134/19.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 out. 2016.

PRATESI, R.; GANDOLFI, L. Doença celíaca: a afecção com múltiplas faces. **J Pediatr**. 2005; 81:357-8.

RAKITA *et al.* Determination of free sulphhydryl groups in wheat gluten under the influence of different time and temperature of incubation: Method validation. **Food Chemistry**. 2014, 150, 166–173.

RAUEN, M. S.; BACK, J. C. V; MOREIRA, E. A. M. Doença celíaca: sua relação com a saúde bucal. **Rev Nutr**. 2005; 18(2):271-6.

R-BIOPHARM. Empresa de desenvolvimento de soluções para diagnósticos clínicos, e análise de alimentos para consumo humano e animal, 1988. Disponível em: <<http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/allergens/gliadin-gluten/item/ridascreen-gliadin>>. Acesso em: 6 de out 2014.

R-BIOPHARM. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of gliadins and corresponding prolamines. Germany: 12-04-18, 20.2012.

R-BIOPHARM. Immunochromatographic test for the detection of Gliadin and corresponding prolamines on surface and in food. Germany: 15-10-11, 28. 2015b.

R-BIOPHARM. RIDA® QUICK Gliadin. Evaluation Card 01/2015a.

R-BIOPHARM. Set of 3 Gliadin Assay Controls. Germany: 13-10-14, 8.2013.

REILLY, N. R. The Gluten-Free Diet: Recognizing Fact, Fiction, and Fad. **J Pediatr**. 2016 Aug;175:206-10.

RICHMAN, E. The safety of oats in the dietary treatment of coeliac disease. **Proc Nutr Soc**. 2012;71(4):534-7.

RODRÍGUES de MIRANDA, A; GONZÁLES, I. M.; PÉREZ, T. G. Orientaciones dietéticas para el paciente celíaco. **Rev Cubana Aliment Nutr** 1998;12(1): 58-61.

RUBIO-TAPIA, A *et al.* Gastroenterology ACo. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. **Am J Gastroenterol**. 2013;108(5):656-76; quiz 77.

SANDBERG, M., *et al* (2003). Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. **European Food Research and Technology**, 217, 344–349.

SAPONE A., *et al*. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. **BMC Med**. 2012; 10:13.

SDEPANIAN, V. L., MORAIS, M. B., FAGUNDES-NETO U. Doença celíaca: a evolução dos conhecimentos desde sua centenária descrição original até os dias atuais. **Arq Gastroenterol**. 1999; 36(4):244-57.

SDEPANIAN, V. L., *et al*. Assessment of Gliadin in Supposedly Gluten-Free Foods Prepared and Purchased by Celiac Patients. **Journal Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 32 (1), 2001.

SEALEY-VOYKSNER, J. A.; *et al*. Novel aspects of quantitation of immunogenic wheat gluten peptides by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1217 (2010) 4167–4183.

SHARMA G. M., PEREIRA M., WILLIAMS K. M. Gluten detection in foods available in the United States – A market Survey. **Food Chemistry** 169 (2015) 120–126.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, 1995. 7, 945–956.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.. Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, (2002) 53, 947–958.

SILVA, Rafael Plaza. **Deteção e quantificação de glúten em alimentos industrializados por técnica de ELISA**. 2010. Dissertação (Pós-graduação em Gastroenterologia Clínica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfndmkaj/https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5147/tde-24112010-164837/publico/RafaelPlazaSilva.pdf. Acesso em: 14 out. 2016.

SILVA, T. S. G.; FURLANETTO, T. W. Diagnóstico de doença celíaca em adultos. São Paulo, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56, n.1, p.122-6, maio/jun. 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302010000100027&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 15 ago. 2015.

SOUZA, S. V. C., *et al*. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(4): 823-836, out.-dez. 2007.

SOUZA, S. V. C. D.; PINTO, C. T.; JUNQUEIRA, R. G. In-house method validation: Application in arsenic analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n. 3, p. 241-247, 2007. ISSN 0889-1575.

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio**: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. 2007. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

STEPNIAK, D.; *et al.* Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 291: G621–G629, 2006.

STORSRUD, S.; YMAN, I. M.; LENNER, R. A. Gluten contamination in oat products and products naturally free from gluten. **European Food Research and Technology**, (2003) 217:481–485.

TATHAM, A. S. *et al.* Extraction, Separation, and Purification of Wheat Gluten Proteins and Related Proteins of Barley, Rye, and Oats. **Methods in Molecular Medicine**. 2000, 41:55-73.

THOMPSON, T. Do oats belong in a gluten-free diet? **Journal of the American Dietetic Association** 97 (1997) 1413 - 1416.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n. 5, p. 835-855, 2002.

THOMPSON T.; MÉNDEZ E. Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not. **J Am Diet Assoc**. 2008; 108:1682-1687.

THOMPSON, T.; LEE, A. R.; GRACE, T. Gluten contamination of grains, seeds, and flours in the United States: A pilot study. **Journal of the American Dietetic Association**, 2010, 110, 937–940.

THOMPSON, T.; SIMPSON, S. A comparison of gluten levels in labeled gluten-free and certified gluten-free foods sold in the United States. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2015, 69, 143-146.

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

VALLADÃO, Sara Araujo. **Avaliação do Método Oficial IN 68/2006 para análise de amido em iogurte**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

VAN ROOYEN, C; VAN DEN BERG, S. Wheat-related disorders: making sense of coeliac disease and other reactions to wheat and gluten. **Current Allergy & Clinical Immunology**, v.28, n. 3, p. 176-184, 2015.

VIM. **Vocabulário Internacional de Metrologia**: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012. 94 p.

WAGA J.; ZIENTARSKI J. Isolation and purification of individual gliadin proteins by preparative acid polyacrylamide gel electrophoresis (a-page) for allergenic research. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**. 2007, v.57, No. 1, p. 91–96.

WIESER H.; ANTES S.; SEILMEIER W. Quantitative Determination of Gluten Protein Types in Wheat Flour by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Cereal Chem**. 1998, 75(5):644-650.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A - Planilha de cálculo de estimativa de incerteza para amostra com concentração próxima a 5 mg/kg



TÍTULO: PLANILHA DE CÁLCULO DE ESTIMATIVA DE INCERTEZA					NÚMERO: DIOM-DIVISA-SQ-LQB FM 0107						
Ensaio: Glúten em alimentos											
Identificação das fontes de incerteza											
Método	Vidraria	Equipamentos		Padrão/ Reagentes			Temperatura / Outros				
Repetitividade		Balança analítica									
		Pipetador automático									
		Pipeta repetidora									
		Leitora de Elisa									
Cálculo da estimativa da incerteza											
Fontes de incerteza	Descrição	Unidade	Valor medida x	Avaliação tipo A ou B	Valor da Incerteza	Graus de liberdade	Distribuição	Divisor	Incerteza padrão u(x)	Variância relativa (u(x)/x)^2	Contribuição %
1	Repetitividade	mg/kg	7,1	A	1,01	11	Normal	3,4641	0,2916	0,00168634	49,19
2	Balança analítica	grama	0,3	B	0,001	Infinito	Retangular	1,7321	0,0006	5,3333E-06	0,16
3	Pipeta repetidora	microlitro	50	B	1,9	Infinito	Retangular	1,7321	1,0970	0,00048133	14,04
4	Pipeta repetidora	microlitro	100	B	3,8	Infinito	Retangular	1,7321	2,1939	0,00048133	14,04
5	Pipet automático 2-10	mililitro	7,5	B	0,08	Infinito	Retangular	1,7321	0,0462	3,7926E-05	1,11
6	Pipet automático 10-100	microlitro	50	B	0,5	Infinito	Retangular	1,7321	0,2887	3,3333E-05	0,97
7	Pipet automático 10-100	microlitro	100	B	0,8	Infinito	Retangular	1,7321	0,4619	2,1333E-05	0,62
8	Pipet automático 100-1000	microlitro	250	B	2,7	Infinito	Retangular	1,7321	1,5588	0,00003888	1,13
9	Leitora de Elisa	ABS	0,681	B	0,0299	Infinito	Retangular	1,7321	0,0173	0,00064254	18,74
10											

Resultado ensaio (y):	7,10	Nível de confiança p:	0,05	Incerteza padrão combinada uc (y)	0,42
Unidade de medida:	mg/kg	GL efetivos ueff:	45	Incerteza padrão expandida U(y)	0,86
		Fator abrangência k:	2,06	Incerteza padrão expandida U(y) %	12,04

Expressão do resultado: **(7,1 ± 0,9) mg/kg**



TÍTULO: PLANILHA DE CÁLCULO DE ESTIMATIVA DE INCERTEZA		NÚMERO: DIOM-DIVISA-SQ-LQB FM 0107
Fontes de incerteza	Referências	
1	DIOM-DIVISA-SQ-LQB-FM-0134 Calculo exatidão repe e repro_Controle B-glúten_Rev 02 (Disponível em: QB/QUALIDADE/Validação/Validação e estudos de metodologias/Gluten)	
2	BALQB-04B (Erro máximo admissível estabelecido para até 50g de acordo com os parâmetros para calibração)	
3	PPASA-76B (Erro + Incerteza informados no certificado de calibração para 50 microlitros = 3,8%)	
4	PPASA-76B (Erro + Incerteza informados no certificado de calibração para 50 microlitros = 3,8%)	
5	PPAQB-10B (Erro máximo admissível estabelecido para 10mL de acordo com os parâmetros de calibração)	
6	PPAQB-20B (Erro máximo admissível estabelecido para 50 uL de acordo com os parâmetros de calibração)	
7	PPAQB-20B (Erro máximo admissível estabelecido para 100 uL de acordo com os parâmetros de calibração)	
8	PPAQB-29B (Erro máximo admissível estabelecido para 500 uL de acordo com os parâmetros de calibração)	
9	Leitora de <i>Elisa</i> em 450 nm com filtro de 630 nm (Erro + incerteza = 4,38%)	
10		

Observações: Onde se lê repetitividade, Fonte de incerteza 1 no quadro "Cálculo da estimativa da incerteza", leia-se reprodutibilidade.

Analista (s): Cristiane Lúcia Goddard

Data: 03/06/2016

Conferido por: Sara A. Valladão

Data: 03/06/2016

APÊNDICE B - Planilha de cálculo de estimativa de incerteza para material de referência de 23,6 mg/kg



TÍTULO: PLANILHA DE CÁLCULO DE ESTIMATIVA DE INCERTEZA				NÚMERO: DIOM-DIVISA-SQ-LQB FM 0107							
Ensaio: Glúten em alimentos											
Identificação das fontes de incerteza											
Método	Vidraria	Equipamentos	Padrão/ Reagentes	Temperatura / Outros							
Repetitividade		Balança analítica									
		Pipetador automático									
		Pipeta repetidora									
		Leitora de Elisa									
Cálculo da estimativa da incerteza											
Fontes de incerteza	Descrição	Unidade	Valor medida x	Avaliação tipo A ou B	Valor da Incerteza	Graus de liberdade	Distribuição	Divisor	Incerteza padrão u(x)	Variância relativa (u(x)/x) ²	Contribuição %
1	Repetitividade	mg/kg	20,87	A	1,92	10	Normal	3,3166	0,5789	0,00076942	30,58
2	Balança analítica	grama	0,3	B	0,001	Infinito	Retangular	1,7321	0,0006	5,3333E-06	0,21
3	Pipeta repetidora	microlitro	50	B	1,9	Infinito	Retangular	1,7321	1,0970	0,00048133	19,13
4	Pipeta repetidora	microlitro	100	B	3,8	Infinito	Retangular	1,7321	2,1939	0,00048133	19,13
5	Pipet automático 2-10	mililitro	7,5	B	0,08	Infinito	Retangular	1,7321	0,0462	3,7926E-05	1,51
6	Pipet automático 10-100	microlitro	50	B	0,5	Infinito	Retangular	1,7321	0,2887	3,3333E-05	1,32
7	Pipet automático 10-100	microlitro	100	B	0,8	Infinito	Retangular	1,7321	0,4619	2,1333E-05	0,85
8	Pipet automático 100-1000	microlitro	250	B	2,7	Infinito	Retangular	1,7321	1,5588	0,00003888	1,55
9	Leitora de Elisa	ABS	0,447	B	0,0197	Infinito	Retangular	1,7321	0,0114	0,0006474	25,73
10											
						4,55	0,0455				
Resultado ensaio (y):		20,87		Nível de confiança p:		95,45		Incerteza padrão combinada uc (y)		1,05	
Unidade de medida:		mg/kg		GL efetivos ueff:		107		Incerteza padrão expandida U(y)		2,12	
				Fator abrangência k:		2,02		Incerteza padrão expandida U(y) %		10,15	
Expressão do resultado:			(20,87 ± 2,1) mg/kg								



TÍTULO: PLANILHA DE CÁLCULO DE ESTIMATIVA DE INCERTEZA	NÚMERO: DIOM-DIVISA-SQ-LQB FM 0107
---	---

Fontes de incerteza	Referências
1	DIOM-DIVISA-SQ-LQB-FM-0134 Calculo exatidão repe e repro_Controle A-glúten_Rev 02 (Disponível em: QB/QUALIDADE/Validação/Validação e estudos de metodologias/Gluten)
2	BALQB-04B (Erro máximo admissível estabelecido para até 50g de acordo com os parâmetros para calibração)
3	PPASA-76B (Erro + Incerteza informados no certificado de calibração para 50 microlitros = 3,8%)
4	PPASA-76B (Erro + Incerteza informados no certificado de calibração para 50 microlitros = 3,8%)
5	PPAQB-10B (Erro máximo admissível estabelecido para 10mL de acordo com os parâmetros de calibração)
6	PPAQB-20B (Erro máximo admissível estabelecido para 50 uL de acordo com os parâmetros de calibração)
7	PPAQB-20B (Erro máximo admissível estabelecido para 100 uL de acordo com os parâmetros de calibração)
8	PPAQB-29B (Erro máximo admissível estabelecido para 500 uL de acordo com os parâmetros de calibração)
9	Leitora de <i>Elisa</i> em 450 nm com filtro de 630 nm (Erro + incerteza = 4,38%)
10	

Observações:

Onde se lê repetitividade, Fonte de incerteza 1 no quadro "Cálculo da estimativa da incerteza", leia-se reprodutibilidade.

Analista (s): Cristiane Lúcia Goddard

Conferido por: Sara A. Valladão

Data: 03/06/2016

Data: 03/06/2016

APÊNDICE C - Planilha de cálculo de estimativa de incerteza para material de referência de 41,8 mg/kg



TÍTULO: PLANILHA DE CÁLCULO DE ESTIMATIVA DE INCERTEZA					NÚMERO: DIOM-DIVISA-SQ-LQB FM 0107						
Ensaio: Glúten em alimentos											
Identificação das fontes de incerteza											
Método	Vidraria	Equipamentos		Padrão/ Reagentes			Temperatura / Outros				
Repetitividade		Balança analítica									
		Pipetador automático									
		Pipeta repetidora									
		Leitora de Elisa									
Cálculo da estimativa da incerteza											
Fontes de incerteza	Descrição	Unidade	Valor medida x	Avaliação tipo A ou B	Valor da Incerteza	Graus de liberdade	Distribuição	Divisor	Incerteza padrão u(x)	Variância relativa (u(x)/x)^2	Contribuição %
1	Repetitividade	mg/kg	40,9	A	2,72	10	Normal	3,3166	0,8201	0,00040207	18,75
2	Balança analítica	grama	0,3	B	0,001	Infinito	Retangular	1,7321	0,0006	5,3333E-06	0,25
3	Pipeta repetidora	microlitro	50	B	1,9	Infinito	Retangular	1,7321	1,0970	0,00048133	22,45
4	Pipeta repetidora	microlitro	100	B	3,8	Infinito	Retangular	1,7321	2,1939	0,00048133	22,45
5	Pipet automático 2-10	mililitro	7,5	B	0,08	Infinito	Retangular	1,7321	0,0462	3,7926E-05	1,77
6	Pipet automático 10-100	microlitro	50	B	0,5	Infinito	Retangular	1,7321	0,2887	3,3333E-05	1,55
7	Pipet automático 10-100	microlitro	100	B	0,8	Infinito	Retangular	1,7321	0,4619	2,1333E-05	0,99
8	Pipet automático 100-1000	microlitro	250	B	2,7	Infinito	Retangular	1,7321	1,5588	0,00003888	1,81
9	Leitora de Elisa	ABS	0,681	B	0,0299	Infinito	Retangular	1,7321	0,0173	0,00064254	29,97
10											

Resultado ensaio (y): 40,90 Nível de confiança p: 0,05 Incerteza padrão combinada uc (y) 1,89
 Unidade de medida: mg/kg GL efetivos ueff: 284 Incerteza padrão expandida U(y) 3,80
 Fator abrangência k: 2,01 Incerteza padrão expandida U(y) % 9,30

Expressão do resultado: (40,9 ± 3,8) mg/kg



TÍTULO: PLANILHA DE CÁLCULO DE ESTIMATIVA DE INCERTEZA		NÚMERO: DIOM-DIVISA-SQ-LQB FM 0107
Fontes de incerteza	Referências	
1	DIOM-DIVISA-SQ-LQB-FM-0134 Calculo exatidão repe e repro_Controle B-glúten_Rev 02 (Disponível em: QB/QUALIDADE/Validação/Validação e estudos de metodologias/Gluten)	
2	BALQB-04B (Erro máximo admissível estabelecido para até 50g de acordo com os parâmetros para calibração)	
3	PPASA-76B (Erro + Incerteza informados no certificado de calibração para 50 microlitros = 3,8%)	
4	PPASA-76B (Erro + Incerteza informados no certificado de calibração para 50 microlitros = 3,8%)	
5	PPAQB-10B (Exatidão para 10mL + 1/3 deste valor conforme descrito no manual de instruções)	
6	PPAQB-20B (Erro máximo admissível estabelecido para 50 uL de acordo com os parâmetros de calibração)	
7	PPAQB-20B (Erro máximo admissível estabelecido para 100 uL de acordo com os parâmetros de calibração)	
8	PPAQB-29B (Erro máximo admissível estabelecido para 500 uL de acordo com os parâmetros de calibração)	
9	Leitora de <i>Elisa</i> em 450 nm com filtro de 630 nm (Erro + incerteza = 4,38%)	
10		

Observações: Onde se lê repetitividade, Fonte de incerteza 1 no quadro "Cálculo da estimativa da incerteza", leia-se reprodutibilidade.

Analista (s): Cristiane Lúcia Goddard

Data: 03/06/2016

Conferido por: Sara A. Valladão

Data: 03/06/2016