

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**ANA LUIZA SOARES DOS SANTOS**

**$\beta$ -LACTOGLOBULINA EM BISCOITOS SEMIDOCES: ESTUDO DE DEGRADAÇÃO  
NO PROCESSAMENTO E POTENCIAL ANTIGÊNICO, VALIDAÇÃO DE MÉTODO E  
AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM**

Belo Horizonte, MG  
2016

**ANA LUIZA SOARES DOS SANTOS**

**$\beta$ -LACTOGLOBULINA EM BISCOITOS SEMIDOCES: ESTUDO DE DEGRADAÇÃO  
NO PROCESSAMENTO E POTENCIAL ANTIGÊNICO, VALIDAÇÃO DE MÉTODO E  
AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM**

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 de grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Scheilla Vitorino C. de Souza Ferreira

Belo Horizonte, MG  
2016

S237b Santos, Ana Luiza Soares dos.  
β-lactoglobulina em biscoitos semidoces: estudo de degradação no processamento e potencial antigênico, validação de método e avaliação da rotulagem / Ana Luiza Soares dos Santos. – 2016.  
135 f. : il.

Orientadora: Scheilla Vitorino C. de Souza Ferreira.

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

1. Alergia a alimentos – Teses. 2. Desnaturação proteica – Teses. 3. Validação de método – Teses. 4. Pesquisa qualitativa – Teses. 5. Biscoito – Teses. 6. Leite – Teses. 7. Teste imunoenzimático – Teses.  
I. Souza, Scheilla Vitorino Carvalho de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 616.975



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

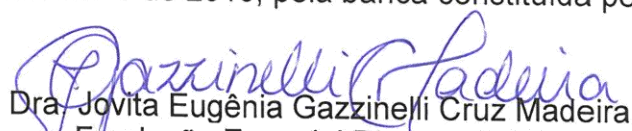
## FOLHA DE APROVAÇÃO


**BETA-LACTOGLOBULINA EM BISCOITOS SEMIDOCES: ESTUDO DE DEGRADAÇÃO NO PROCESSAMENTO E POTENCIAL ANTIGÊNICO, VALIDAÇÃO DE MÉTODO E AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM**


### **ANA LUIZA SOARES DOS SANTOS**

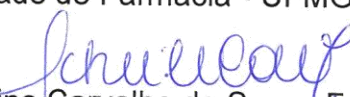
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 30 de setembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

  
Dra. Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira  
Fundação Ezequiel Dias - FUNED

  
Profa. Dra. Denise Carmona Cara Machado  
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

  
Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda  
Faculdade de Farmácia - UFMG

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

Belo Horizonte, 30 de setembro de 2016.

## **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 Laboratório de Química Bromatológica do Instituto Octávio Magalhães (IOM) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Pesquisadora MSc. Cláudia Aparecida de Oliveira e Silva, pelo empréstimo de equipamentos, treinamento e colaboração nos ensaios de imunoabsorção enzimática.

Ao Laboratório de Serviço de Análise de Produtos para Saúde do IOM da FUNED pelo empréstimo de equipamentos.

Ao Laboratório de Imunobiologia (LIB) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, Pesquisadores Profa. Dra. Ana Maria Caetano, MSc. Luísa Lemos Santos e Helder Carvalho de Assis, pela parceria e colaboração nos ensaios *in vivo*, que representam a continuidade das investigações do presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 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 minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra Scheilla Vitorino C. de Souza, pela orientação, disponibilidade, amizade e apoio, nesses cinco anos de orientação.

À Cláudia Aparecida de Oliveira, por poder compartilhar seus conhecimentos, tão importantes para o delineamento e execução deste trabalho.

Ao Pedro Paulo Borges pela amizade, parceria, compromisso e paciência durante cada etapa do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Eduardo Costa Soares e Gustavo Almeida Amaral, alunos de iniciação científica, pela disposição, dedicação e responsabilidade.

Aos professores do PPGCA, em especial ao Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira, pela disponibilidade e auxílio, principalmente na análise estatística.

Aos membros da banca examinadora Dra. Jovita Gazzinelli Eugênia Cruz Madeira e Profas. Dra. Denise Carmona Cara e Inayara Cristina Alves Lacerda, que se disponibilizaram a contribuir para melhoria deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bromatologia - Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos (BRO-UPAA) da FAFAR/UFMG, pelo incentivo e companheirismo.

Aos amigos do Hospital Risoleta Tolentino Neves, pelo incentivo, amizade e por compreenderem os momentos de ausência.

À minha mãe Rosi, ao meu pai Adilson e aos meus irmãos Pedro, Maria Clara, João Vitor e Vinicius, por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Ao Luiz, pelo amor, carinho, compreensão e por sempre estar ao meu lado paciente e solícito.

## RESUMO

A  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ LG) é a mais abundante proteína do soro do leite e desempenha um papel importante na alergia à proteína do leite de vaca (APLV), alergia alimentar mais prevalente em crianças, que representam o grupo populacional maior consumidor de biscoitos. Apesar da verificação da adequação da rotulagem e do desenvolvimento de metodologias para determinação de alérgenos em alimentos constituírem ferramentas fundamentais no controle da APLV, estudos relacionados a esses temas são restritos na literatura. Sabe-se, ainda, que o processamento térmico promove mudanças conformacionais nas proteínas alergênicas, embora a literatura seja controversa sobre seu impacto no potencial antigênico. O presente estudo teve como objetivos avaliar a degradação e antigenicidade de  $\beta$ LG no processamento de biscoitos, validar um kit de ELISA comercial para determinação desta proteína em biscoitos e avaliar a rotulagem de biscoitos semidoces comercializados Minas Gerais, Brasil. Formulações com 0,25 % de leite foram assadas, sob diferentes condições de temperatura (150, 180 e 210 °C) e tempo (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos), e analisadas por ELISA, em duplicata. Para a validação, amostras de biscoitos sem leite, adicionadas de padrão de  $\beta$ LG nas concentrações de 0,25 mg/kg a 13,5 mg/kg, mais o branco, em 20 replicatas por nível, foram analisadas pelo kit de ELISA. A rotulagem de dezoito amostras comerciais de biscoitos semidoces foi avaliada. Redução significativa do teor de  $\beta$ LG, e conseqüentemente na antigenicidade, foi evidenciada com 15 minutos de assamento em todas as temperaturas estudadas ( $p < 0,05$ ). Os decaimentos atingiram 89,7; 92,6 e 100 % para assamentos a 150, 180 e 210 °C, respectivamente. O kit foi considerado adequado para o propósito de detecção de  $\beta$ LG, embora não tenha apresentado desempenho satisfatório numa abordagem de validação quantitativa. Taxa de seletividade de 100 % foi estimada para as amostras sem o analito. Taxas de sensibilidade de 70, 80 e 100 % foram calculadas para os níveis 0,25; 0,5 e a partir de 1,0 mg/kg, respectivamente. O método foi considerado padronizado, com valores de acordância entre 0,5 e 1,0 e de concordância entre 0,7 e 1,0, sendo alcançados valores máximos para o nível 0 mg/kg e a partir do nível 1,0 mg/kg. Seletividade foi demonstrada em relação ao interferente ovoalbumina. Na análise de rotulagem foi identificada uma redução no percentual de não conformidades em 2016 quando comparado a 2014-2015, embora 22,2 % dos rótulos analisados em 2016 não estavam em conformidade com a regulamentação de alergênicos.

**Palavras-chave:** alergia alimentar; desnaturação proteica; validação intralaboratorial; métodos qualitativos; biscoito;  $\beta$ -lactoglobulina; leite; ELISA

## ABSTRACT

The  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ LG) is the most abundant whey protein and plays an important role in allergy to cow's milk (CMA) that represents the most common food allergy in children -the largest consumer of biscuits. Despite the analysis of labeling and the development of methodologies for determination of allergens in foods constitute fundamental tools for the control of CMA, studies related to these topics are restricted in the literature. Also, it is known that the thermal processing promotes conformational changes in allergenic proteins, although the literature is controversial about the impact on the antigenic potential. The objective of this work was to evaluate the degradation and antigenicity of the  $\beta$ LG in processed biscuits, to validate a commercial ELISA kit for the determination of this protein in biscuits and to evaluate the labeling of semi-sweet biscuits from Minas Gerais, Brazil. Semi-sweet biscuits with 0.25% milk were cooked under different conditions of temperature (150, 180 and 210 °C) and time (5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes) and analyzed by ELISA in duplicate. For validation, biscuits formulated without milk and spiked with  $\beta$ LG standard at 0.25 mg/kg to 13.5 mg/kg, plus the unspiked sample, were analyzed by ELISA kit, being 20 replicates per level. The labeling of eighteen semi-sweet biscuits commercial samples was analyzed. Significant reduction in  $\beta$ LG content and, consequently, in the antigenicity was observed with 15 minutes of baking for all studied temperatures ( $p < 0.05$ ). The reduction reached 89.7, 92.6 and 100 % for 150, 180 and 210 °C, respectively. The kit was considered adequate for the purpose of  $\beta$ LG detection, although it has not shown satisfactory performance in a quantitative validation approach. Selectivity rate of 100% was estimated for the samples without the analyte. Sensitivity rates of 70 80 and 100% were calculated for the levels 0.25; 0.5; and from 1.0 mg/kg, respectively. The method was considered standardized with accordance values between 0.5 and 1.0 and concordance between 0.7 and 1.0, with maximum values achieved for the level 0 mg/kg and from level 1.0 mg/kg. Selectivity was demonstrated for ovalbumin as interferent. In labeling analysis a reduction in the percentage of non-conformity was identified for 2016 when compared to 2014-2015, while 22.2% of the labels analyzed in 2016 were not compliant to the regulation of allergens.

Keywords: food allergy; protein denaturation; house validation; qualitative methods; biscuit;  $\beta$ -lactoglobulin; milk; ELISA



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tipos de reações adversas a alimentos.....	28
<b>Figura 2.</b> Sequência de eventos nas reações de hipersensibilidade imediata.....	31
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da estrutura de $\beta$ -lactoglobulina.....	42
<b>Figura 4.</b> Fluxograma do processamento dos biscoitos semidoces tipo Maria.....	78
<b>Figura 5.</b> Delineamento experimental para o estudo de degradação da $\beta$ -lactoglobulina no assamento de biscoitos semidoces tipo Maria.....	83
<b>Figura 6.</b> Delineamento experimental para o estudo de validação do kit de ELISA para detecção de $\beta$ -lactoglobulina em biscoitos semidoces.....	86
<b>Figura 7.</b> Delineamento experimental para avaliação da rotulagem de biscoitos semidoces comercializados em MG.....	92
<b>Figura 8.</b> Gráfico de probabilidade da normal ( <i>Q-Q Plot</i> ) para resultados do estudo de degradação de $\beta$ -lactoglobulina em biscoitos semidoces.....	93
<b>Figura 9.</b> Perfil de degradação da $\beta$ -lactoglobulina sob diferentes condições de tempo e temperatura de assamento em experimento fatorial completo 6 x 3.....	95
<b>Figura 10.</b> Perfil dos produtos assados sob diferentes condições de tempo e temperatura de assamento e percentual de decaimento no teor de $\beta$ -lactoglobulina em relação ao teor obtido no tempo de 5 minutos de assamento a 150 °C .....	96
<b>Figura 11.</b> Porcentagens de recuperação individuais obtidas no na determinação de $\beta$ -lactoglobulina em biscoito semidoce pelo kit de ELISA RIDASCREEN FAST $\beta$ -Lactoglobulin® .....	100
<b>Figura 12.</b> Perfil de resultados de acordância na faixa de concentração de $\beta$ -lactoglobulina avaliada .....	106
<b>Figura 13.</b> Perfil de resultados de concordância na faixa de concentração de $\beta$ -lactoglobulina avaliada .....	106

**Figura 14.** Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear do tipo probito para  $\beta$ -lactoglobulina .....107

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Porcentagem de sensibilização às diferentes frações proteicas do leite.....	39
<b>Tabela 2.</b> Formulações de biscoitos semidoces do tipo Maria descritas na literatura...	66
<b>Tabela 3.</b> Condições de tempo e temperatura para assamento de biscoitos semidoces.....	68
<b>Tabela 4.</b> Formulações dos biscoitos semidoces tipo Maria para uso experimental.....	76
<b>Tabela 5.</b> Níveis de concentração de $\beta$ -lactoglobulina adicionados nas amostras de biscoito para estudo de validação .....	84
<b>Tabela 6.</b> Análise de variância dos resultados do experimento fatorial 6 x 3 .....	94
<b>Tabela 7.</b> Médias de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, obtidos na determinação de $\beta$ -lactoglobulina em biscoito semidoce pelo kit de ELISA RIDASCREEN FAST $\beta$ -Lactoglobulin® .....	99
<b>Tabela 8.</b> Taxas de falsos-negativos, falsos-positivos, de sensibilidade, de seletividade e de confiabilidade obtidas na detecção de $\beta$ -lactoglobulina em biscoito semidoce pelo kit de ELISA RIDASCREEN FAST $\beta$ -Lactoglobulin® .....	104
<b>Tabela 9.</b> Acordância e concordância estimadas na detecção de $\beta$ -lactoglobulina em biscoito semidoce pelo kit de ELISA RIDASCREEN FAST $\beta$ -Lactoglobulin® .....	105
<b>Tabela 10.</b> Taxas de falsos-positivos, de falsos-negativos e de confiabilidade obtidas para amostras brancas e adicionadas de $\beta$ -lactoglobulina, em nível com 100 % de confiabilidade, na presença de ovalbumina .....	108
<b>Tabela 11.</b> Lista de verificação da rotulagem de biscoitos semidoces em relação aos requisitos da legislação brasileira.....	110

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
A-AEP	Solução tampão de extração do alérgeno contendo aditivo
ACO	Acordância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APLV	Alergia à proteína do leite de vaca
ASBAI	Associação Brasileira de Alergia e Imunologia
BRO-UPAA	Laboratório de Bromatologia - Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos
BSA	Albumina do soro bovino
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação
CON	Concordância
CP	Consulta Pública
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPRr	Desvio padrão relativo sob condições de repetibilidade
DPRR	Desvio padrão relativo sob condições de precisão intermediária
$e_i$	Resíduo
EAST	<i>Enzyme Allergosorbent Test</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, em inglês <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FALCPA	<i>Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act</i>
Fc	Receptor de alta afinidade
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSS	<i>Food Safety Surveys</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GMP	Glicomacropéptidos
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IDR	Ingestão Diária Recomendada

IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon gama
INC	Informação Nutricional Complementar
INS	Sistema Internacional de Numeração
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IOM	Instituto Octávio Magalhães
LD	Limite de detecção
LIB	Laboratório de Imunobiologia
LQ	Limite de quantificação
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
MR	Material de referência
MRC	Material de referência certificado
MS	Espectrometria de massas
NC	Não conformidade
NCHS	<i>National Center for Health Statistics</i>
P	Significância
PCR	Reação em cadeia da polimerase
$q_i$	Valor normal esperado (quantil da normal)
$R^2$	Coeficiente de determinação
RAST	<i>Radio Allergosorbent Test</i>
RIE	<i>Rocket Immuno Electrophoresis</i>
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPC	Região de perda de confiabilidade
$R_{RJ}$	Coeficiente de correlação de Ryan-Joiner
SGQ	Sistemas de gestão da qualidade
T regs	Células T reguladoras
TCF	Taxa de confiabilidade
TFN	Taxa de falsos negativos
TFP	Taxa de falsos positivos

TGF- $\beta$	Fator de crescimento tecidual beta
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 2
TSB	Taxa de sensibilidade
TST	Taxa de seletividade
VD	Valores Diários
$\alpha$ LA	Alfa-lactoalbumina
$\beta$ LG	Beta-lactoglobulina

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3. REVISÃO</b> .....	<b>23</b>
3.1. ALERGIA ALIMENTAR .....	23
3.1.1. Epidemiologia .....	23
3.1.2. Fatores de risco .....	25
3.1.3. Mecanismos .....	28
3.1.4. Tratamento .....	32
3.2. ALERGIA A PROTEÍNA DO LEITE DE VACA (APLV) .....	34
3.2.1. Proteínas do leite .....	37
3.2.1.1. <i>Proteínas do soro</i> .....	40
3.2.2. Estabilidade de proteínas lácteas .....	43
3.3. REGULAMENTAÇÃO PARA ALIMENTOS ALERGÊNICOS .....	46
3.3.1. Legislação.....	47
3.3.2. Métodos de análise .....	50

3.3.2.1. Validação.....	56
3.4. BISCOITOS.....	62
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>70</b>
4.1. EQUIPAMENTOS.....	70
4.2. MATERIAIS.....	71
4.3. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	72
4.3.1 Reagentes .....	72
4.3.2 Soluções .....	73
4.4. INSUMOS.....	75
4.5. AMOSTRAS.....	75
4.5.1. Formulações para estudo de degradação e validação do kit .....	75
4.5.2. Comerciais .....	78
4.6. DETERMINAÇÃO DE $\beta$ LG POR ELISA .....	79
4.7. ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE $\beta$ LG NO PROCESSAMENTO DE BISCOITOS SEMIDOCES .....	80
4.7.1 Delineamento experimental .....	80
4.7.2. Análise estatística .....	81
4.8. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETEÇÃO DE $\beta$ LG EM BISCOITOS SEMIDOCES .....	84
4.8.1. Delineamento experimental .....	84
4.8.2. Análise estatística - Abordagem quantitativa .....	87
4.8.3. Análise estatística - Abordagem qualitativa.....	87



4.9. AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM DE AMOSTRAS COMERCIAIS .....	88
4.9.1. Delineamento experimental .....	88
4.9.2. Análise de dados .....	92
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>93</b>
5.1. ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE $\beta$ LG NO PROCESSAMENTO DE BISCOITOS SEMIDOCES .....	93
5.2. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETEÇÃO DE $\beta$ LG EM BISCOITOS SEMIDOCES .....	98
5.2.1. Abordagem quantitativa .....	98
5.2.2. Abordagem qualitativa.....	103
5.3. AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM DE AMOSTRAS COMERCIAIS .....	108
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>114</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>115</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A alergia alimentar é definida como um efeito adverso à saúde decorrente de uma resposta imune específica que ocorre após exposição a um determinado alimento (BOYCE et al., 2010). Trata-se de um importante problema de saúde pública que afeta crianças e adultos (BOYCE et al., 2010; SICHERER et al., 2011), podendo causar efeitos sociais e psicológicos sobre o cotidiano da população atingida, interferindo na sua qualidade de vida (BRANUM & LUKACS, 2008; GUPTA et al., 2011).

Estudos epidemiológicos sugerem o aumento dos casos de alergia alimentar na última década (LACK, 2008; BOYCE et al., 2010; JACKSON et al., 2013). A alergia à proteína do leite de vaca (APLV) se destaca como a responsável pela maioria dos quadros de alergia alimentar na infância (MORAIS et al., 2013), sendo mais comum no primeiro ano de vida, por compreender uma das primeiras proteínas a serem introduzidas na alimentação infantil (MORAIS et al., 2013).

O leite, sem outra especificação, é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002b). Trata-se de uma emulsão de glóbulos de gordura em uma suspensão de micelas, em uma fase aquosa (GONZÁLEZ et al., 2001). É constituído por macronutrientes e micronutrientes que desempenham papel significativo na nutrição e saúde humana (BAUMAN et al., 2006), constituindo uma das principais fontes de proteínas de alto valor biológico e importante fonte de aminoácidos essenciais. O leite contém cerca de 30 a 35 g/L de proteínas, que são divididas em caseínas e proteínas do soro do leite, as quais perfazem cerca de 80 % e 20 % do total das proteínas lácteas, respectivamente (CULBERTSON et al., 2005; SOUZA & ROSÁRIO, 2012).

A beta-lactoglobulina ( $\beta$ LG) é a mais abundante proteína do soro do leite, conhecida como uma das proteínas alergênicas que desempenham papel importante na APLV (ASBAI, 2012). Indivíduos sensibilizados à  $\beta$ LG, quando em contato com o referido alérgeno, em decorrência de alimentos no qual o leite ou seus subprodutos são utilizados como ingredientes ou de casos de

contaminação de alimentos processados, podem sofrer danos à saúde e até reações severas como anafilaxia (ASBAI, 2008; ASBAI 2012).

A base do tratamento da APLV é a dieta de exclusão do leite de vaca e de seus derivados. Essa terapia nutricional objetiva evitar o desencadeamento dos sintomas, a progressão da doença e a piora das manifestações alérgicas, além de proporcionar crescimento e desenvolvimento adequado, no caso de crianças (ASBAI, 2008; ASBAI, 2012). A leitura criteriosa e a interpretação adequada de rótulos de alimentos representam cuidados importantes no manejo da APLV, visto que a presença de alérgenos não declarados nos alimentos caracteriza um perigo potencial para saúde (VIERK et al., 2002).

O principal meio de comunicação pelo qual os fabricantes podem informar aos consumidores sobre a presença de alérgenos, permitindo o gerenciamento do risco de manifestações clínicas adversas, é a rotulagem (BRASIL, 2015b). Dessa forma, rótulos com informações claras e precisas sobre a composição dos alimentos são essenciais para que os consumidores portadores de alergia possam identificar a presença de constituintes que têm o potencial de causar complicações clínicas, evitando o seu consumo (BRASIL, 2013).

Nos EUA, a declaração de alergênicos nos rótulos de todos os alimentos embalados é regulamentada, desde 2004, pelo *Food and Drug Administration* (FDA), após a publicação da *Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act* (FALCPA). Tal legislação se tornou obrigatória no ano de 2006 para oito alérgenos, incluindo leite, ovos, peixes, mariscos e crustáceos, nozes, amendoim, trigo e soja (FDA, 2013). Na Europa, a Diretiva 2007/68/EC, que trata a declaração de ingredientes que são considerados alergênicos em alimentos comercializados, inclui treze alimentos alergênicos que devem ser declarados, como leite, ovos, trigo, amendoim, peixes, crustáceos, soja, castanhas, gergelim, frutos do mar, mostarda, aipo e tremoço.

Recentemente, no Brasil, foi aprovada a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 26/2015 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares, com o objetivo de proporcionar aos consumidores acesso às informações relativas à presença

dos principais alimentos que causam alergias alimentares na rotulagem dos alimentos embalados (BRASIL, 2015a).

O leite, como um todo ou como frações de soro de leite ou caseína, é um ingrediente comum em alimentos processados e se encontra na lista dos principais alérgenos que devem ser declarados nos rótulos (BRASIL, 2015a). A regulamentação atual exige que a rotulagem de alimentos que contenham leite como ingrediente apresentem as seguintes declarações “Alérgicos: contém leite”, “Alérgicos: contém derivados de leite” ou “Alérgicos: contém leite e seus derivados”. Nos casos em que não for possível garantir a ausência de contaminação cruzada dos alimentos por leite, o rótulo deverá constar da declaração “Alérgicos: pode conter leite” (BRASIL, 2015a).

Dessa forma, com a finalidade de assegurar o cumprimento da rotulagem de alimentos e aumentar a proteção ao consumidor, é preciso realizar ações de controle de qualidade e segurança alimentar, como monitoramentos para verificação da adequação da rotulagem. O desenvolvimento de metodologias para detecção e/ou quantificação de alérgenos constitui ponto fundamental para o monitoramento e controle de alergênicos em alimentos (POMS et al., 2004). A escolha do método depende do composto a ser detectado, da matriz alimentar e dos processos tecnológicos empregados, além das condições de extração do alérgeno (DIAZ-AMIGO & POPPING, 2010).

Segundo alguns autores, o processamento industrial, empregando altas temperaturas, pode reduzir o potencial alergênico dessas proteínas interferindo na sua detecção (SOUZA & ROSÁRIO, 2012; MURARO et al., 2014). No entanto, há controvérsias na literatura, baseadas na argumentação de que o mecanismo de desnaturação induzida pela temperatura envolve principalmente o efeito da temperatura sobre a estabilidade de interações não covalentes. Dessa forma, as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, que são de natureza exotérmica, são desestabilizadas, e interações hidrofóbicas, que são endotérmicas são estabilizadas com o aumento da temperatura. Na faixa de temperatura entre 30 °C e 55 °C, a  $\beta$ LG é dissociada em monômeros; em temperaturas acima de 60 °C, seus monômeros se desdobram aumentando a reatividade do grupo tiol livre; e a 95°C, há completa desnaturação, com

extensa transformação conformacional e exposição de grupos nucleofílicos altamente reativos (CULBERTSON et al., 2005).

Neste contexto, os biscoitos se destacam dentre as matrizes para monitoramento de proteínas alergênicas. Tais produtos são obtidos pela mistura de farinhas, amidos e ou féculas com diversos outros ingredientes, incluindo alérgenos, como o leite. Os biscoitos, fermentados ou não, são submetidos a processos de amassamento e cocção (BRASIL, 2005), de forma que o potencial alergênico, após o processamento constitui tópico controverso. Alguns autores referem que o processamento industrial, empregando altas temperaturas, pode reduzir o potencial alergênico de proteínas interferindo na sua detecção (DOWNS & TAYLOR, 2010; MONACI et al., 2011; KHUDA et al., 2012; BLOOM et al., 2014) e outros evidenciaram aumento da antigenicidade da  $\beta$ LG quando essa proteína é aquecida (KLEBER et al., 2004; BU et al., 2009).

Nos últimos anos, os biscoitos vêm se destacando, ainda, como produtos de grande interesse comercial, em decorrência de sua variedade de formas e sabores; longa vida de prateleira; praticidade na produção, comercialização e consumo (MANLEY, 1996; SANTOS et al., 2010); além de grande poder atrativo, principalmente para as crianças (LOPES, et al., 2012); sendo o comércio mundial liderado pelos Estados Unidos da América (EUA), Brasil e China (ABIMAPI, 2015).

Existem vários métodos disponíveis para a detecção e quantificação de alergênicos alimentares baseados em técnicas imunológicas, cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (MS) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (POMS et al., 2004).

Os imunoenaios como o ensaio de imunoadsorção enzimática, em inglês *enzyme linked immunosorbent assay*, (ELISA) são ferramentas valiosas na avaliação e gestão de riscos e podem ser utilizados pelas agências reguladoras de alimentos para fiscalização e proteção dos consumidores alérgicos (DIAZ-AMIGO, 2010), assim como pelas indústrias processadoras. São reconhecidos como métodos práticos, de resposta rápida e baixo limite de detecção (LD). No entanto, trabalhos de validação de kits de ELISA para detecção de alérgenos do leite em alimentos são restritos na literatura

(MATSUDA et al., 2006; STUMR et al., 2009; DIAZ-AMIGO, 2010; LORENZO et al., 2010; DECKWART et al., 2014; KATO et al., 2015) e nenhum método para tal propósito foi normalizado e submetido aos testes de validação interlaboratoriais da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (MURARO et al., 2014).

Independentemente da técnica utilizada, todo o trabalho para manutenção de uma estrutura de monitoramento da qualidade de alimentos, visando à segurança alimentar, tem como base o grau de confiabilidade dos métodos analíticos utilizados (GOWIK, 2009; GONDIM, 2012). A validação de métodos é uma importante ferramenta compreendida nos sistemas de gestão da qualidade laboratoriais que, juntamente com procedimentos de controle de qualidade interno e externo, que permite aos laboratórios produzirem dados analíticos confiáveis (THOMPSON et al., 2002; GONDIM, 2012).

Tendo em vista a elevada produção e consumo de biscoito no Brasil e no mundo, aliada à elevada probabilidade deste produto conter quantidades traços de proteínas alergênicas como a  $\beta$ LG, se faz necessário estudar a degradação de  $\beta$ LG durante o processamento de biscoitos e o potencial antigênico da proteína degradada. Ainda, a validação de uma metodologia para determinação de  $\beta$ LG em biscoitos por ELISA é fundamental para avaliação da rotulagem de alérgenos no contexto das ações de promoção da saúde pública.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a degradação de  $\beta$ LG no processamento de biscoitos semidoços, bem como os efeitos antigênicos dos resíduos desta proteína; validar uma metodologia para determinação da  $\beta$ LG em biscoitos por ELISA, visando subsidiar ações de controle de qualidade de alimentos e de promoção da saúde; e realizar uma análise crítica da rotulagem destes produtos diante da regulamentação de alergênicos no Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um experimento fatorial completo para avaliar o perfil de degradação de  $\beta$ LG no processamento de biscoitos semidoços, sob diferentes condições de tempo e temperatura de assamento.
- Avaliar a capacidade de detecção, por kit comercial de ELISA, dos níveis residuais de  $\beta$ LG após degradação pelo assamento.
- Validar um kit comercial de ELISA para determinação de  $\beta$ LG na matriz biscoito semidoço, empregando abordagens quantitativa e qualitativa.
- Avaliar a rotulagem de biscoitos semidoços, comercializados no estado de Minas Gerais, frente aos requisitos regulamentados de rotulagem de alimentos, antes e após a regulamentação de alergênicos no Brasil.
- Analisar criticamente as estratégias adotadas pelas indústrias frente à regulamentação da rotulagem de alergênicos.

### 3. REVISÃO

#### 3.1 ALERGIA ALIMENTAR

##### 3.1.1 Epidemiologia

A alergia alimentar pode ser definida como uma resposta imune específica e anormal frente à exposição aos antígenos introduzidos por meio da alimentação (BOYCE et al., 2010). Trata-se de um importante problema de saúde pública que afeta crianças e adultos (BOYCE et al., 2010; SICHERER, 2011). A alergia alimentar pode causar efeitos sociais e psicológicos que interferem na qualidade de vida da população atingida (BRANUM & LUKACS, 2008; GUPTA et al., 2011).

Estudos epidemiológicos sugerem o aumento dos casos de alergia alimentar na última década (LACK, 2008; BOYCE et al., 2010; JACKSON et al., 2013). Dados do Inquérito Nacional de Saúde realizado pelo *National Center for Health Statistics* (NCHS), nos EUA, no período de 2007 a 2010, envolvendo 20.686 indivíduos, indicaram prevalência geral de alergia alimentar em 8,96 % da população estudada, sendo 6,53 % e 3,51 % em crianças e adultos, respectivamente (MC GOWAN & KETT, 2013).

GUPTA et al. (2011), em estudo também realizado nos EUA com 38.480 pais de crianças, reportaram prevalência de alergia alimentar em 8 % da população estudada, o que correspondeu a uma estimativa de 5,9 milhões de crianças atingidas. Múltiplas alergias alimentares foram encontradas em 2,4 % da população em estudo e 3 % relataram experiência de reações severas, com manifestação de sintomas de anafilaxia, pressão arterial baixa, dificuldade para respirar associada a vômitos, angioedema e tosse.

Em pesquisa recente realizada pela *Food and Drug Administration* (FDA) *Food Safety Surveys* (FSS) foi avaliada a prevalência de alergia auto reportada em adultos norte americanos, nos anos de 2001, 2006 e 2010. No referido estudo foi demonstrado o aumento da prevalência de alergia alimentar auto reportada em adultos, visto que foram computados 570 adultos (13 %) em 2010 e 737 adultos (14,9 %) 2006, em relação aos 471 (9 %) no ano de 2001. A



prevalência de alergia auto reportada confirmada por diagnóstico médico foi significativamente superior em 2006 (385 adultos - 7,6 %) quando comparado a 2001 (279 adultos - 5,3 %), sem aumento significativo em 2010 (323 adultos - 6,5 %) (VERRILL et al., 2015).

No Canadá, a prevalência de alergia alimentar é similar à encontrada nos EUA. SOLLER et al. (2012), em pesquisa desenvolvida com 9.667 indivíduos, identificaram uma prevalência de alergia alimentar de 7,4 % em crianças e de 6,6 % em adultos, sugerindo que a prevalência geral de alergia alimentar reportada seria de aproximadamente 6,7 %.

Na Europa, a prevalência de alergia alimentar estimada por revisão sistemática feita por NWARU et al. (2014), envolvendo 75 trabalhos publicados de 2000 a 2012, resultou em 5,9 % de casos auto relatados, sendo as crianças o público mais acometido.

A maioria dos estudos publicados sobre a prevalência de alergia alimentar foi conduzida na Europa e América do Norte, sendo limitada a literatura sobre esse tema na América Latina (SANCHÉZ & SANCHÉZ, 2015). No Brasil, os estudos sobre a prevalência de alergia alimentar também são restritos.

NASPITZ et al. (2004), em estudo caso controle, investigaram a prevalência de alergia mediada por alérgenos inalantes e alimentares no Brasil. A Imunoglobulina E (IgE) sérica total e específica a esses alérgenos foram determinadas em 457 crianças acompanhadas em serviços de alergia pediátrica e em um grupo controle (n=62). Dentro do grupo de alérgicos, observou-se presença de IgE sérica específica positiva para alimentos em 3,5 % dos casos, dos quais 20,3 % foram referentes as proteínas do leite de vaca.

VIEIRA et al. (2010) realizaram um estudo observacional transversal em 9.478 pacientes com sintomas sugestivos de APLV avaliados por gastroenterologistas pediátricos de cinco diferentes regiões do Brasil (Norte, Centro, Oeste, Sudeste e Sul). A prevalência e a incidência de APLV na população estudada foram de 5,4 % e 2,2 %, respectivamente.

GUIMARÃES et al. (2015), em estudo transversal realizado na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, avaliaram a frequência de alergia alimentar

reportada por pais de crianças e de pré-escolares. Os autores utilizaram questionários auto aplicáveis validados que foram respondidos por 3.897 pais (n=9.265). A prevalência de alergia alimentar reportada foi de 23,5 % em crianças e de 17,6 % em pré-escolares. O principal alimento mencionado como causador de alergia alimentar foi o leite de vaca, com frequência de 52,8 % nas crianças e de 42,7 % nos pré-escolares.

Estudos que definem a prevalência das alergias alimentares em diferentes populações no âmbito mundial ainda são restritos (LACK, 2008). Determinações precisas sobre a prevalência de alergia alimentar se tornam questionáveis, diante das diferentes definições de alergia, populações estudadas e metodologias do estudo (BERIN & SICHERER, 2011; KIM et al., 2011; SICHERER, 2011).

### 3.1.2 Fatores de risco

As alergias são doenças complexas e multifatoriais (ASBAI, 2008). Algumas teorias são postuladas para justificar o aumento da prevalência da alergia alimentar. Predisposição genética, período neonatal, tipo de parto ao nascimento, aleitamento materno exclusivo, introdução da alimentação complementar, composição da microbiota intestinal e “hipótese de privação microbiana” são sugeridos como fatores de risco para o desenvolvimento de alergias alimentares (ODIJIK et al., 2003; HADDELAND et al., 2005; BRANDTZAEG, 2010; MARTINO & PRESCOTT, 2010; NEU & RUSHING, 2011; SICHERER, 2011; McBRIDE et al., 2012; GRIMSHAW et al., 2014).

Sugere-se que o desenvolvimento de alergia alimentar em recém-nascidos possa ser decorrente da predisposição genética e epigenética (MARTINO & PRESCOTT, 2010). É bem documentado que uma criança com histórico familiar de alergia está mais predisposta a se tornar alérgica (ODIJIK et al., 2003; McBRIDE et al., 2012).

A dieta materna, a exposição a toxinas, poluição, medicamentos e cigarro, podem modificar a expressão dos genes no período intrauterino favorecendo a imaturidade das células T reguladoras (T regs) e linfócitos T

*helper*1 (Th1) que normalmente inibem a diferenciação dos linfócitos T *helper*2 (Th2), aumentando o risco do desenvolvimento de reações alérgicas (MARTINO & PRESCOTT, 2010).

A influência do tipo de parto ao nascimento, também tem sido estudada. O aumento dos partos cesarianos se relaciona com o aumento das doenças do sistema imunológico e crianças nascidas deste tipo de parto parecem ser mais sujeitas ao desenvolvimento de alergia alimentar caso tenham predisposição genética para alergia (BRANDTZAEG, 2010). Segundo esta tese, a exposição à microbiota vaginal e intestinal materna durante o parto normal proporcionam maior desenvolvimento da microbiota intestinal do bebê favorecendo o desenvolvimento do sistema imunológico, já no parto cesariana essa exposição não acontece, podendo comprometer a colonização intestinal infantil (NEU & RUSHING, 2011).

A dieta da gestante e da nutriz e a idade da introdução de alimentos sólidos e de alimentos alergênicos também têm sido investigadas no desenvolvimento da alergia alimentar (ODIJK et al., 2003). O primeiro ano de vida é fundamental para a programação e modulação do sistema imunológico, pois neste período o organismo do lactente vai desenvolver a capacidade de selecionar entre resposta imunológica ativa ou tolerância oral (ASBAI, 2008)

Sabe-se que o leite materno possui efeito protetor no desenvolvimento de alergias (ODIJK et al. 2003). O aleitamento materno exclusivo, sem a introdução de leite de vaca, de fórmulas infantis à base de leite de vaca e de alimentos complementares, até os seis meses, tem sido ressaltado como eficaz na prevenção do aparecimento de sintomas alérgicos, tanto em famílias com predisposição para alergia quanto naquelas sem predisposição (ODIJK et al., 2003).

O aleitamento materno exclusivo promove colonização intestinal por bifidobacterias e lactobacilos, pelo fato do leite conter oligossacarídeos e microrganismos probióticos (SARINHO & ALVES, 2013). O leite materno também fornece fator de crescimento tecidual beta (TGF- $\beta$ ) e interleucina dez (IL-10), que induzem a secreção de imunoglobulina A (IgA) mucosa que tem efeito imunossupressor por diferenciar células T independentes em células T regs, além de inibir a penetração de antígenos (SARINHO & ALVES, 2013).

Atualmente, o desmame tem sido cada vez mais precoce e abrupto, com suspensão total do leite materno e introdução de fórmulas lácteas e alimentos diversos, aumentando o número de antígenos que precisam ser avaliados pelo sistema imunológico em desenvolvimento e modificando a microbiota intestinal como resultado da mudança alimentar (SARINHO & ALVES, 2013).

Segundo SICHERER (2011), a ingestão de alimentos processados em detrimento do consumo de frutas e verduras na primeira infância também é um fator que contribuiu para o aumento da alergia nas últimas décadas. Em estudo prospectivo realizado no Reino Unido, observou-se que a ingestão de frutas e verduras exerceu efeito protetor ao desenvolvimento de alergia alimentar, por serem fontes de substâncias imunomoduladoras como antioxidantes e ácidos graxos da família ômega-3 (GRIMSHAW et al., 2014).

De acordo com GREENE (1999), os antioxidantes (ácido ascórbico, betacaroteno, alfa tocoferol, selênio e zinco) podem neutralizar o efeito deletério do estresse oxidativo presente na inflamação alérgica e, conseqüentemente, reduzir a lesão tecidual. Para YU et al. (1998), os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, e os mediadores sintetizados a partir deles, regulam a função imunológica interferindo no desenvolvimento e na gravidade dos sintomas relacionados à doença atópica.

Ademais, mudanças nas práticas alimentares, de higiene e médicas alteraram o padrão de exposição e a composição da microbiota intestinal nos seres humanos (BRANDTZAEG, 2010). Como postulado na “hipótese de privação microbiana”, por HADDELAND et al. (2005) e BRANDTZAEG (2010), o aumento da incidência de alergia alimentar nas sociedades ocidentalizadas é explicado pela exposição microbiana reduzida na infância. A estimulação imunológica reduzida resulta na diminuição da atividade celular do linfócito Th1 e, por conseguinte, um nível insuficiente de interferon gama (INF- $\gamma$ ) para regulação cruzada da liberação de IgE induzida pela resposta das células Th2.

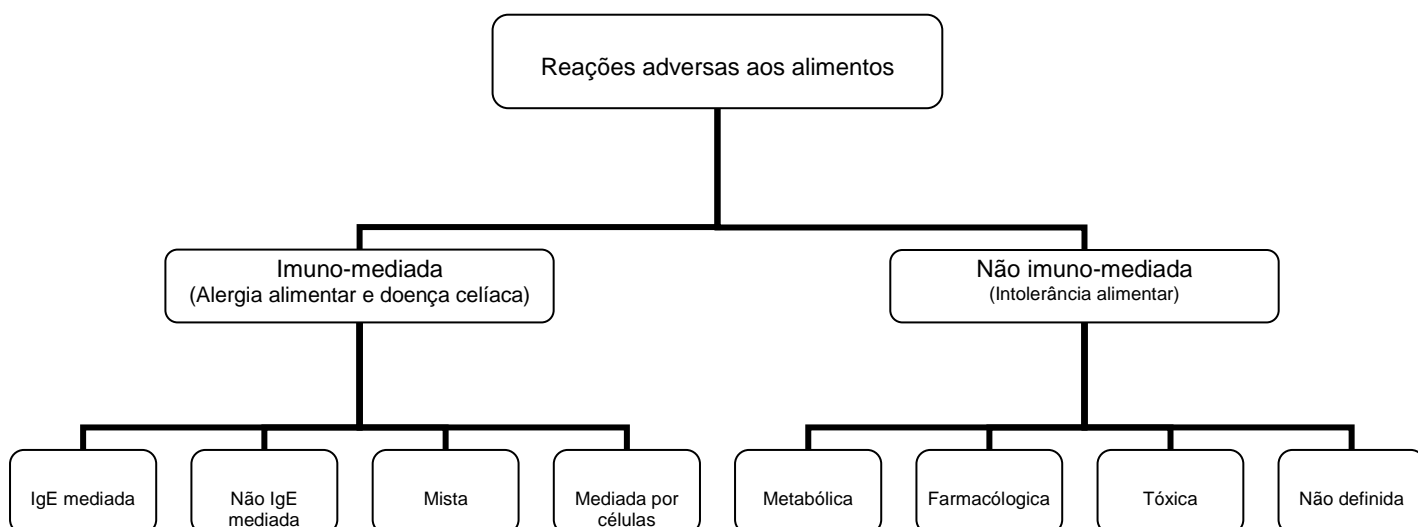
De acordo com o Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar (ASBAI, 2008), algumas medidas preventivas para lactentes com risco para ocorrência de alergia alimentar podem ser colocadas em prática, como manutenção do aleitamento materno exclusivo até o primeiro semestre de vida, retardando a introdução precoce de alimentos sólidos e, em casos de necessidade de utilizar

fórmula infantil durante o período de aleitamento, é recomendado o uso de fórmulas hipoalergênicas ou hidrolisadas.

### 3.1.3 Mecanismos

Alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos (JOHANSSON et al., 2004), podendo ser definida como um efeito adverso à saúde decorrente de uma resposta imunológica específica e anormal aos antígenos alimentares introduzidos no organismo por via oral (ASBAI, 2008; BOYCE et al., 2010). A alergia inclui respostas imunológicas mediadas pela IgE, não mediadas por IgE e reações mistas (**Figura 1**) (ASBAI, 2008).

**Figura 1.** Tipos de reações adversas a alimentos.



Fonte: BOYCE et al. (2010).

As reações mediadas por IgE caracterizam por um aumento na capacidade dos linfócitos B sintetizarem a imunoglobulina do isotipo IgE contra antígenos que acessam o organismo via ingestão, inalação ou penetração pela pele, acarretando no aparecimento de sinais e sintomas agudos. As reações não mediadas por IgE apresentam sintomas subagudos ou crônicos, (FERREIRA & SEIDMAN, 2007) são mediadas por linfócitos T e compreendem as reações citotóxicas, incluindo proteínas alimentares que induzem enteropatias, proctite e enterocolite (FERREIRA & SEIDMAN, 2007; ASBAI,

2008; BURKS et al., 2012). Já as reações mistas envolvem respostas mediadas por IgE, linfócitos T e citocinas pró-inflamatórias (FERREIRA & SEIDMAN, 2007; ASBAI, 2008). Exemplos clínicos dessas reações incluem esofagite, gastrite e gastrenterite eosinofílica, dermatite atópica, asma e hemossiderose (ASBAI, 2008; FERREIRA & SEIDMAN, 2007; BURKS et al., 2012).

Nas reações mediadas por IgE, quando um antígeno proteico é ingerido, o mesmo é clivado por enzimas digestivas no estômago e intestino delgado. Alguns antígenos, no entanto, escapam dessa digestão ou são parcialmente degradados e podem ser absorvidos intactos (WAKABAYASHI et al., 2006). Segundo SILVA (2010), as proteínas ingeridas por meio da alimentação, inteiras ou parcialmente digeridas, atravessam as células epiteliais do intestino e entram em contato com o tecido linfoide, associado à mucosa intestinal, sendo capturadas, processadas e apresentadas aos linfócitos T por células apresentadoras de antígenos.

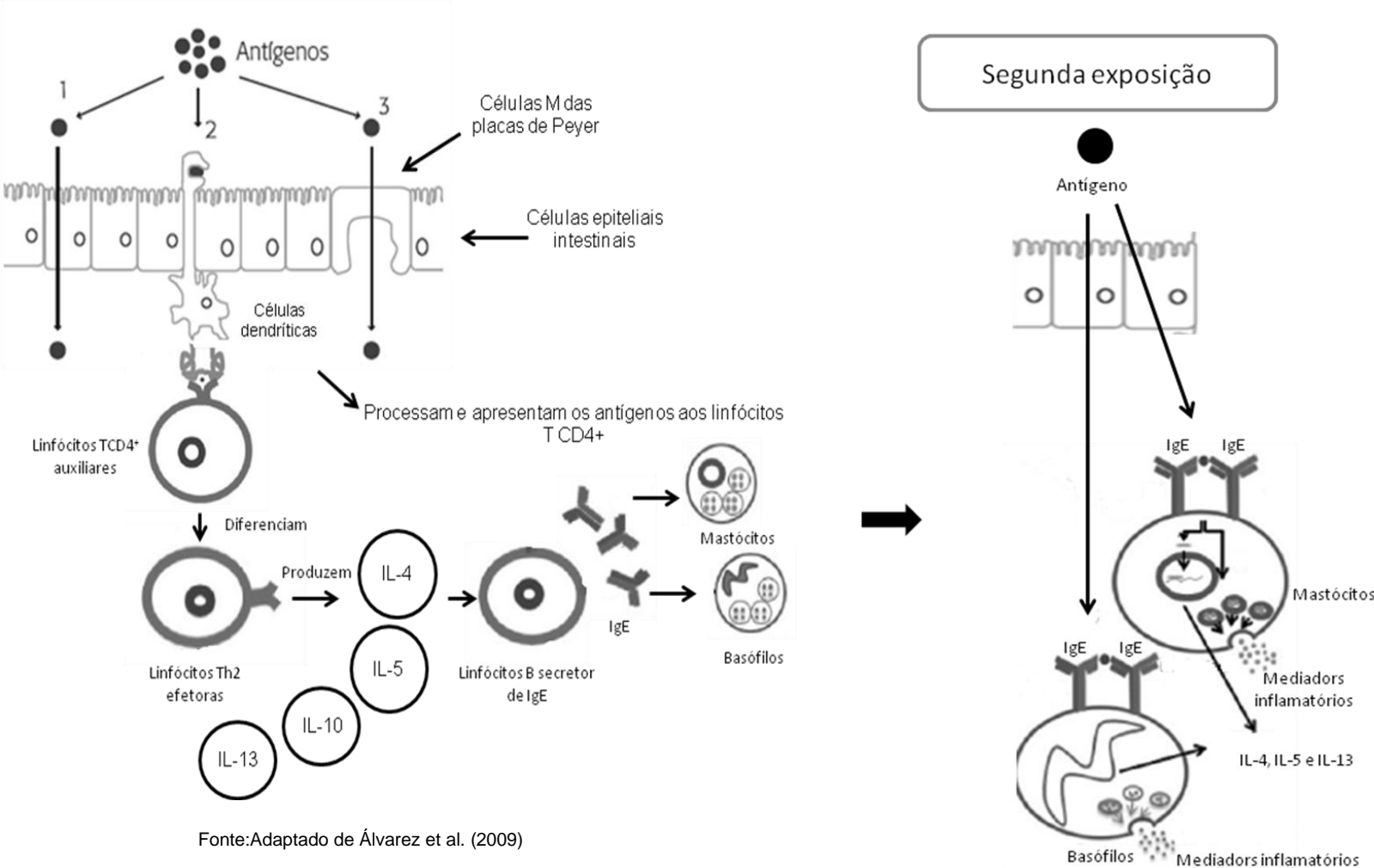
Os antígenos podem atravessar a camada de células epiteliais do intestino através de suas junções, através das células M das placas de Peyer ou serem capturados por células dendríticas. Tais células transportam os antígenos aos linfonodos de drenagem, processam e os apresentam aos linfócitos TCD4 auxiliares. Essas células, então, se diferenciam no subgrupo Th2 de células efetoras que, quando estimuladas, produzem uma diversidade de citocinas, incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que ativam a troca do isotipo de imunoglobulina dos linfócitos B para IgE. Os anticorpos IgE possuem uma cadeia  $\epsilon$  que liga-se ao receptor Fc dos mastócitos e basófilos. Após segunda exposição ao antígeno, ocorre ativação dos mastócitos que secretam mediadores inflamatórios pré formados (histamina e serotonina), mediadores lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos) e citocinas que são responsáveis pelas reações patológicas da hipersensibilidade imediata (**Figura 2**) (ABBAS, 2008; ASBAI, 2008; BURKS et al., 2012).

A ligação de histamina causa contração celular, aumento da permeabilidade vascular e estímulo de relaxantes vasculares para as células do músculo lisos, provocando vasodilatação (ABBAS, 2008). Por outro lado também pode causar constrição da musculatura lisa intestinal, causando

aumento do peristaltismo após ingestão do alérgeno (ABBAS, 2008). As prostaglandinas atuam nas células da musculatura lisa e sustentam a vasodilatação promovida pela histamina (ABBAS, 2008).

A fase tardia da reação alérgica ocorre com a produção de leucotrienos, citocinas (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, entre outras) e também quimiocinas produzidas por mastócitos (ABBAS, 2008). Esses mediadores promovem o recrutamento de eosinófilos e células Th2 que expressam receptores de produção de quimiocinas, como a eotaxina (ABBAS, 2008}.

**Figura 2.** Sequência de eventos nas reações de hipersensibilidade imediata.





Conforme descrito por DOURADO (2006), as diferenças nas quantidades de mediadores inflamatórios liberados no intestino, na taxa de absorção dos antígenos ingeridos e na distribuição de mastócitos ligados à IgE específica ao antígeno determinam a ocorrência de diferentes sintomas após a reação alérgica alimentar. Segundo FINKELMAN et al. (2005), os sintomas também irão refletir a quantidade de anticorpos IgA e imunoglobulina G (IgG) capazes de neutralizar o antígeno antes que esses possam se ligar nas moléculas de IgE na superfície dos mastócitos.

As reações alérgicas a alimentos são reações de hipersensibilidade imediata a alimentos ingeridos que levam a liberação de mediadores dos mastócitos da mucosa e submucosa intestinais (ABBAS, 2008). Podem afetar muitos órgãos e, dessa forma, causar uma variedade de sintomas distintos (BRANDTZAEG, 2010). As manifestações clínicas incluem reações gastrintestinais, cutâneas, respiratórias e sistêmicas (ASBAI, 2008).

#### 3.1.4 Tratamento

Uma vez estabelecido o diagnóstico de alergia alimentar, o tratamento preconizado pela Associação Brasileira de Alergia e Imunologia (ASBAI) é a exclusão dietética do alérgeno responsável pelas manifestações clínicas. Determina-se que os alimentos reconhecidos e supostamente envolvidos na alergia alimentar, incluindo seus derivados e preparações que o contenham, devam ser totalmente excluídos (ASBAI, 2008). No entanto, não são recomendadas pela ASBAI restrições desnecessárias e dietas muito restritivas, visto que a identificação e exclusão apenas do alérgeno é importante por fornecer uma alimentação qualitativa e quantitativamente adequada (ASBAI, 2008).

O tratamento nutricional nas alergias alimentares tem como objetivo evitar o desencadeamento dos sintomas, a progressão da doença e a piora das manifestações alérgicas e, no caso de crianças, proporcionar crescimento e desenvolvimento adequados (ASBAI, 2008).

Segundo o Consenso Brasileiro de Alergia Alimentar, a avaliação adequada do estado nutricional do indivíduo alérgico com o objetivo de planejar e adequar a ingestão alimentar às necessidades nutricionais de acordo com os tipos de alimentos permitidos é prioritária (ASBAI, 2008). As substituições alimentares visam garantir à oferta nutricional adequada as necessidades nutricionais preconizadas (ZEIGER, 2003).

Além disso, são recomendadas pela ASBAI a inspeção e a leitura minuciosa dos rótulos de alimentos consumidos que possam conter alérgenos (ASBAI, 2008). Os rótulos devem ser lidos periodicamente antes da aquisição do produto, pois modificações na composição podem ser comuns com o passar do tempo (ASBAI, 2008).

Também é sugerida pela ASBAI (2008) a busca por informações detalhadas sobre ingredientes específicos que entram na composição nutricional de alimentos, diretamente com a indústria, por meio dos serviços de atendimento ao consumidor, e com prestadores de serviços de alimentação e nutrição, como restaurantes, cantinas e lanchonetes.

Recentemente, estratégias terapêuticas de dessensibilização da alergia alimentar vêm sendo discutidas. Segundo KHORIATY & UMETSU (2013), as alergias ao leite vaca, ovo, trigo e soja geralmente são transitórias em crianças, com 80 % de chance de se resolver até os 16 anos de idade. Em contraste, a alergia alimentar persistente geralmente começa na infância e persiste até a idade adulta (KHORIATY & UMETSU, 2013). Nesse caso, é importante instituir estratégias terapêuticas adequadas, pois pacientes com alergia alimentar persistente podem ser candidatos a terapias de dessensibilização, como a imunoterapia oral (KHORIATY & UMETSU, 2013).

A imunoterapia oral é uma abordagem ativa e amplamente investigada para a alergia alimentar persistente (KHORIATY & UMETSU, 2013). Conforme descrito por KHORIATY & UMETSU (2013), neste método, o alimento alergênico é administrado por via oral, a partir de doses baixas que são aumentadas gradativamente, baseando no pressuposto de que a exposição oral/intestinal para os antígenos leve à tolerância.

A tolerância oral é definida como uma diminuição da reatividade humoral e/ou celular após imunização com antígeno que foi previamente administrado

por via oral (MOWAT, 1999; FARIA & WEINER, 2005; SMITH & NAGLER-ANDERSON, 2005; SILVA, 2010). Segundo SILVA (2010), a tolerância oral não é condicionada à capacidade do sistema digestivo em quebrar os componentes da dieta, mantendo-os “invisíveis” ao sistema imune. Pelo contrário, como descrito por TSUJI & KOSAKA (2008) e SILVA (2010), os antígenos são ativamente apresentados e processados pelo tecido linfóide associado ao intestino e utilizados para ativar mecanismos supressores da reatividade imune inflamatória. Para SILVA (2010), quando a tolerância oral é induzida, vários aspectos da reatividade imune antígeno específica Th1 e Th2 são suprimidos, com a diminuição da produção de imunoglobulinas (IgE, IgM, IgG e IgA), da reação de hipersensibilidade tardia e produção de algumas citocinas.

### 3.2 ALERGIA A PROTEÍNA DO LEITE DE VACA (APLV)

Os antígenos que provocam as reações alérgicas, chamados de alérgenos, são em geral proteínas ambientais comuns (HELM & BURKS, 2000). Na sua maior parte são representados por glicoproteínas hidrossolúveis, com peso molecular entre 10 kDa e 70 kDa, resistentes ao aquecimento, ação de ácidos e proteases (ASBAI, 2008). Essas características estruturais são responsáveis por protegerem os antígenos da desnaturação e da degradação no trato gastrointestinal, permitindo sua absorção intacta (HUSBY et al., 1987; HELM et al., 2002). Dessa forma, tais substâncias se tornam capazes de estimular a respostas imunológicas (ASBAI, 2008).

Segundo DOURADO (2006) e SAMPSON (1999), a maioria dos indivíduos em contato com os antígenos alimentares não produz IgE específica e nem desenvolve reações potencialmente nocivas. No entanto, reações mediadas pela IgE podem ser desencadeadas em indivíduos geneticamente susceptíveis quando as barreiras fisiológicas são rompidas.

São descritos no Consenso Brasileiro de Alergia Alimentar mais de 170 alimentos que podem causar reações alérgicas (ASBAI, 2008). Entretanto, poucos alimentos são responsáveis pela grande maioria das alergias alimentares, sendo os principais alérgenos descritos pela ASBAI (2008), o leite de vaca, o ovo, o trigo, o milho, o amendoim, as castanhas, os peixes e os

frutos do mar. Segundo SEIBOLD (2005), as alergias aos ovos e ao leite de vaca são observadas com maior frequência em crianças, enquanto as alergias a frutos do mar e amendoim são causas mais comuns de alergia em adultos.

A APLV é responsável pela maioria dos quadros de alergia alimentar na infância (MORAIS et al., 2013). Para EIGENMANN (2009), o fato da proteína do leite ser uma das primeiras proteínas a serem introduzidas na alimentação infantil, somado ao sistema imunológico imaturo dos neonatos e lactentes, favorece a sensibilização a esse alérgeno, contribuindo para que a APLV seja mais comum no primeiro ano de vida.

A prevalência de APLV varia consideravelmente nos diferentes estudos existentes. Em metanálise conduzida por RONA et al. (2007), com estudos originais publicados desde 1990, foi evidenciada uma variação na prevalência auto referida da alergia ao leite entre 1,2 % e 17 %. No Brasil, a taxa de prevalência, em estudo realizado por VIERA et al. (2010), foi de 5,4 %.

A base do tratamento da APLV é a dieta de exclusão do leite de vaca e de seus derivados (ASBAI, 2012). Contudo, o fato de a APLV atingir crianças em uma fase da vida em que se observa rápida velocidade de crescimento e desenvolvimento, a dieta de exclusão deve ser respaldada por um diagnóstico preciso, para que não comprometa o pleno potencial de crescimento e desenvolvimento das crianças que são alérgicas às proteínas do leite (ASBAI, 2012; MORAIS et al., 2013).

No Guia Prático de Diagnóstico e Tratamento da APLV, é recomendado que, para as crianças alérgicas a leite, que estejam na fase de introdução da alimentação complementar, devam ser seguidos os mesmos princípios preconizados para crianças saudáveis (ASBAI, 2012). Ressalta-se, neste guia, que não deve haver restrição na introdução de alimentos contendo outras proteínas alergênicas, como ovos, peixes e carnes de boi, frango e peixe (ASBAI, 2012).

A homologia entre as proteínas do leite de vaca com as proteínas do leite de outros mamíferos merece atenção, podendo ocorrer reatividade clínica cruzada em 92 % dos casos (FIOCCHI et al., 2010). Dessa forma, não é recomendada pela ASBAI (2012) a utilização de leites de outros mamíferos por crianças com APLV.

Segundo ASBAI (2012), fórmulas extensamente hidrolisadas e fórmulas infantis a base de aminoácidos são indicadas para crianças com idade inferior a seis meses portadores APLV, enquanto os preparados e bebidas a base de soja e arroz não devem ser utilizados para lactentes com idade inferior a seis meses.

A educação continuada para a família é considerada um dos pilares da terapia nutricional na APLV. A ASBAI (2012) recomenda a leitura criteriosa e a interpretação adequada de rótulos de alimentos e de outros produtos industrializados como cosméticos e medicamentos para prevenção das manifestações clínicas da alergia alimentar.

Os alimentos que possuam em sua lista de ingredientes os termos: leite (*in natura*, condensado, em pó, evaporado, achocolatado, maltado, fermentado); queijo, coalhada, iogurte, creme de leite, chantilly, manteiga, farinha láctea, chocolate ao leite, caseína, caseinato, lactoalbumina, lactoglobulina, lactulose, lactose, proteínas do soro, *whey protein*, proteína láctea ou composto lácteo não devem ser consumidos por indivíduos com APLV (ASBAI, 2012). Produtos com citações “contém traços de leite” ou “pode conter traços de leite”, também merecem atenção (ASBAI, 2012).

A tolerância às proteínas submetidas a tratamento térmico por pacientes com APLV é tratada de maneira contraditória na literatura.

MONACI et al. (2006) discutiram que alterações na conformação dos determinantes antigênicos como resultado da perda da estrutura terciária, pode reduzir o potencial antigênico da proteína. De acordo com BERIN & SICHERER (2011), de 70 % a 80 % das crianças com APLV podem tolerar a ingestão de proteínas extensivamente aquecidas. Tais autores relataram que indivíduos que incorporaram leite aquecido tiveram dezesseis vezes mais probabilidade de alcançar a tolerância ao leite normal em comparação com aqueles que não o fizeram.

Estudos indicam, ainda, que o cozimento diminui a alergenicidade da alfa-lactoalbumina ( $\alpha$ LA) e da  $\beta$ LG justificando a melhor tolerância do leite cozido por alguns indivíduos alérgicos (WEGRZYN et al., 2008). Segundo BOAS et al. (2014), vários estudos têm focado na utilização de diferentes

processos físicos, químicos ou enzimáticos para redução do potencial antigênico das proteínas do soro do leite.

Na pesquisa realizada por KIM et al. (2011), foi demonstrado que a tolerância aos produtos lácteos assados é um indicador de prognóstico para o desenvolvimento de tolerância ao leite de vaca e que a inclusão de produtos lácteos assados na dieta diária tem influência positiva sobre o desenvolvimento de tolerância.

Segundo SOUZA & ROSÁRIO (2012), nas reações alérgicas mediadas por IgE, os anticorpos circulantes reconhecem regiões moleculares específicas na superfície do antígeno, chamadas de epítopos, os quais são classificados pela sequência específica de aminoácidos em epítopos sequenciais ou lineares, ou pelas dobras e configuração de suas cadeias proteicas em epítopos conformacionais. Para WEGRZYN et al.(2008) e SOUZA & ROSÁRIO (2012) os processos de aquecimento e fervura do leite modificam apenas os epítopos conformacionais que são os principais responsáveis pela APLV, encontrados principalmente na  $\beta$ LG, dessa forma perdem sua capacidade de ligação aos anticorpos IgE específicos, ao passo que os epítopos sequenciais mantêm sua potencialidade alergênica após a fervura.

No entanto, segundo a ASBAI (2012), devido à necessidade e confirmação destes achados, ainda é recomendado que sejam adotadas as orientações de tratamento da APLV com a exclusão do alérgeno mesmo em produtos processados.

### 3.2.1 Proteínas do leite

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). Segundo BEZERRA et al. (2010) é uma secreção das glândulas mamárias, rico em energia, proteínas, sais minerais e vitaminas, utilizada para alimentar os mamíferos em sua primeira fase de vida.

Trata-se de uma dispersão mista de aspecto branco, opaco, levemente adocicado, tendendo à neutralidade, constituído de uma emulsão de gorduras

em uma suspensão de micelas de proteínas em estado coloidal (caseína) e carboidratos (lactose), sais (citratos), vitaminas B e C em uma fase aquosa (GONZÁLEZ et al., 2001; BEZERRA et al., 2010; BRITO et al., 2011).

De acordo com BAUMAN et al. (2006) o consumo de leite é de grande importância para o crescimento e desenvolvimento, por se tratar de fonte de lipídios, proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e de compostos bioativos, os quais desempenham papel significativo na nutrição e saúde. Estima-se que o leite seja composto por mais de 100.000 tipos diferentes de moléculas e sua composição pode sofrer variações de acordo com o estágio de lactação, idade, raça, nutrição, e estado de saúde do animal (FONSECA & SANTOS, 2000; GONZÁLEZ, 2001).

O leite constitui uma das principais fontes de proteínas de alto valor biológico, sendo importante fonte de aminoácidos essenciais na alimentação humana, contendo cerca de 30 g/L a 35 g/L de proteínas, que são divididas em caseínas e proteínas do soro do leite, as quais perfazem cerca de 80 % e 20 % do total das proteínas lácteas, respectivamente (CULBERTSON et al., 2005; SOUZA & ROSÁRIO, 2012).

A caseína, proteína que está presente em maior quantidade no leite é subdividida em  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\gamma$ , possuem estruturas similares, que se agregam na forma de micelas granulares multimoleculares compostas por várias proteínas similares, água e minerais, como cálcio e fósforo (GONZÁLEZ et al., 2001). A forma organizacional da caseína é importante para o processo digestivo do leite no estômago e intestino e, também, no processamento de produtos lácteos e para separação dos componentes proteicos dos outros componentes do leite (GONZÁLEZ et al., 2001).

As proteínas do soro do leite são consideradas como proteínas de rápida digestão, liberando altas concentrações de aminoácidos no plasma após a ingestão (HAUG et al., 2007). São constituídas de todos os aminoácidos essenciais em concentrações superiores às das principais fontes vegetais (HAUG et al., 2007). As proteínas do soro possuem elevada concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), que exercem importância no crescimento e reparo dos tecidos, e de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina), que aumentam a função imunológica por meio da conversão

intracelular de glutathione (ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW, 2008). Tais proteínas são solúveis em ampla faixa de pH, apresentam estrutura globular e contêm pontes dissulfeto, que conferem certa estabilidade estrutural (AIMUTIS, 2004). As principais frações das proteínas do soro são  $\beta$ LG,  $\alpha$ LA, albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig) e glicomacropéptidos (GMP) (HARAGUCHI et al., 2006; SOUZA & ROSÁRIO, 2012).

Sabe-se que cerca de vinte componentes proteicos do leite são dotados de diferentes graus de atividade antigênica que podem induzir a formação de anticorpos específicos em indivíduos geneticamente predispostos (ASBAI, 2012; KODA & BARBIERI, 1985). Segundo MONACI et al. (2006), todas as proteínas do leite, englobando as proteínas do soro e da caseína, podem ser consideradas potencialmente alérgicas, pois possuem estrutura tridimensional que desempenham um importante papel na manutenção da conformação dos epítomos. Tais epítomos são distribuídos em todo proteoma do leite de vaca e podem ser responsáveis por reações alérgicas.

A  $\beta$ LG e  $\alpha$ LA, presentes na fração do soro de leite, são consideradas as proteínas mais antigênicas (BOAS et al., 2014). Estudos em indivíduos alérgicos ao leite de vaca revelaram que a sensibilidade dos mesmos a cada fração proteica obedeceu às frequências relacionadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Porcentagem de sensibilização às diferentes frações proteicas do leite

Fração proteica	Indivíduos sensíveis (%)
Beta-lactoglobulina	66 a 82
Caseína	43 a 60
Alfa-lactalbumina	41 a 53
Globulina do soro bovino	27
Albumina do soro bovino	18

Fonte: KODA & BARBIERI (1985).

Além da importância na alimentação e nutrição, as proteínas do leite possuem aplicações industriais, devido suas propriedades tecnológicas como agente espumante, emulsificante e geleificante (SGARBIERI, 1996). Dessa forma, são utilizadas na produção de diversos produtos, como pães, bolos, biscoitos, sorvetes e doces.



### 3.2.1.1 *Proteínas do soro do leite*

O soro de leite é um coproduto da indústria de laticínios que representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação de queijos ou da caseína (ALVES et al., 2014). Conforme ALVES et al. (2014), para produzir 1 kg de queijo são gerados em média de 9 L de soro.

O soro pode ser obtido em laboratório ou em indústrias de processamento de leite, por coagulação enzimática, resultando na coagulação das caseínas, matéria prima para a produção de queijos, e no soro doce; por precipitação ácida no pH isoelétrico das caseínas ( $pI = 4,6$ ), resultando na caseína isoelétrica e no soro ácido; e por separação física das micelas de caseína por microfiltração, em membranas de  $0,1 \mu m$ , obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro (MORIN et al., 2007; ALVES et al., 2014).

O soro é um líquido opaco e de cor amarelo-esverdeada (GIRALDO-ZUÑIGA et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2010; ALVES et al., 2014). Segundo ALVES et al. (2014), contém, aproximadamente, 55 % dos nutrientes do leite como proteínas solúveis, lactose, vitaminas, minerais e uma quantidade mínima de gordura. O soro pode ser utilizado na sua forma original, para produção de bebidas lácteas, ou concentrado, com a finalidade de agregar valor ao produto e a seus derivados (ALVES et al., 2014).

Segundo ALVES et al. (2014), um elevado volume de soro de leite é produzido, anualmente, no Brasil. Grande parte da produção é proveniente das pequenas e médias queijarias de Minas Gerais. No entanto, é descrito que o país importa um alto volume deste produto, pois não possui tecnologias de beneficiamento adaptadas à realidade nacional (ALVES et al., 2014).

Segundo PRAZERES et al. (2012), o soro é considerado uma substância poluente, pois possui conteúdo elevado de substâncias orgânicas. Dessa forma, seu descarte como efluente é proibido (ALVES et al., 2014).

O soro pode ser utilizado como ingrediente, para melhorar as propriedades tecnológicas, funcionais (solubilidade, geleificação, viscosidade, emulsificação e formação de espuma) e nutritivas por conter proteínas de alto valor biológico e por apresentarem em sua composição aminoácidos essenciais

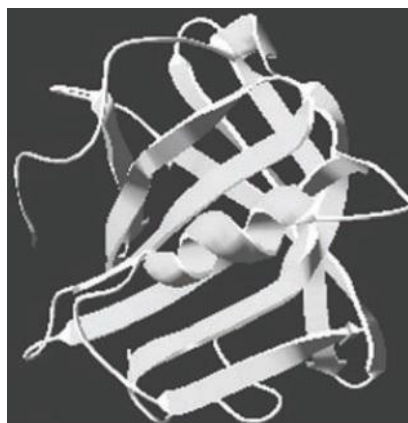
que não são sintetizados pelo próprio organismo (BAUMAN et al., 2006; ALVES et al., 2014). No entanto, tem sido utilizado indevidamente em alguns alimentos, por constituir um produto barato e abundante, caracterizando fraude (FUSELLI et al., 2015).

FUSELLI et al. (2015) definem a fraude em alimentos como uma ação intencional que é realizada, muitas vezes, com propósitos de ganho financeiro. Para os autores as fraudes envolvem adulteração, falsificação, substituição e rotulagem inadequada, afetando toda a cadeia produtiva, além de representar risco potencial para a saúde dos consumidores (FUSELLI et al., 2015). Consumidores alérgicos ou intolerantes às proteínas do soro são afetados em magnitude ainda maior, pelo fato de sofrerem reações adversas à saúde (FUSELLI et al., 2015). Dessa forma, torna-se importante avaliar produtos que possam ter quantidades traços de proteínas do soro e realizar rotulagem adequada.

A  $\beta$ LG (**Figura 3**) é a fração mais abundante do soro do leite, representando, aproximadamente, 10 % da proteína total do leite e 50 % da proteína do soro (CULBERTSON et al., 2005; ALVES et al., 2014). Essa proteína apresenta peso molecular médio que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino (HARAGUCHI et al., 2006).

Constituída por 162 aminoácidos, a  $\beta$ LG é uma proteína globular, com massa molecular (MM) de 18,3 kDa, contém um grupo sulfidril livre (-SH) e duas pontes dissulfeto intramoleculares (-S-S-), ligando CyS66 - CyS160 e CyS106 - CyS119 (STANIĆ-VUČINIĆ & VELIČKOVIĆ, 2013). A estrutura secundária consiste de folhas  $\beta$  antiparalelas formadas por nove cordas  $\beta$  ( $\beta$ -strands). A estrutura cristalina mostra que os monômeros consistem predominantemente de folhas- $\beta$  (50 %) e uma pequena porção de  $\alpha$ -hélice (15 %), estruturas ao acaso (15 %) e estruturas em volta ou *turns* (20 %). A  $\beta$ LG apresenta polimorfismo genético, sendo que as variantes A e B são as mais comuns (HARAGUCHI et al., 2006).

**Figura 3.** Representação esquemática da estrutura de  $\beta$ -lactoglobulina.



Fonte: STANIĆ-VUČINIĆ & VELIČKOVIĆ (2013).

Conforme descrito por CULBERTSON et al. (2005), a  $\beta$ LG pode ser influenciada por parâmetros como pH, temperatura, teor de proteínas e condições iônicas. Abaixo do pH 3,5, a BLG se dissocia em monômeros, na faixa de pH de 3,5 e 5,2 forma tetrâmeros e octâmeros, e acima do pH 7,5 se desdobra com aumento da reatividade do grupo tiol (CULBERTSON et al., 2005). A proporção de dímeros aumenta com o aumento da concentração de proteína e força iônica. Na faixa de temperatura entre 30 °C e 55 °C, a  $\beta$ LG é dissociada em monômeros, em temperaturas superiores a 60 °C seus monômeros se desdobram, aumentando a reatividade do grupo tiol livre, e a 95 °C há completa desnaturação, com extensa transformação conformacional, exposição de grupos nucleofílicos altamente reativos (CULBERTSON et al., 2005).

Ademais, a  $\beta$ LG possui propriedades tecnológicas e funcionais determinadas por suas características físico químicas, tais como viscosidade, gelificação, formação de espuma, solubilidade e emulsificação, sendo utilizada em produtos alimentares (STANIĆ-VUČINIĆ & VELIČKOVIĆ, 2013). Esta proteína do soro também possui elevado valor nutricional e pode servir como excipiente para nutrientes e fármacos lipofílicos (STANIĆ-VUČINIĆ & VELIČKOVIĆ, 2013).

Entretanto, a  $\beta$ LG é o principal alérgeno do leite, desempenhando papel importante na APLV (ASBAI, 2012). Tal proteína não está presente no leite humano, apresenta estrutura hidrofóbica e estabilidade em pH ácido o que a

torna resistente à digestão, principalmente à ação da pepsina (CHICÓN et al., 2008; HOCHWALLNER et al., 2014). Essa resistência resulta na ausência de fragmentação de sequências específicas de aminoácidos, que podem sensibilizar indivíduos e desencadear o processo alérgico, mesmo quando a proteína é administrada em baixas concentrações (MOUÉCOUCOU et al., 2007). Além disso, essa característica também pode estar relacionada à APLV em crianças amamentadas exclusivamente por leite materno, pois proteínas alergênicas, tais como a  $\beta$ LG, ingeridas pela mãe, passam de forma intacta pela mucosa intestinal e podem ser excretadas no leite materno (WAL, 2004).

### 3.2.2 Estabilidade das proteínas lácteas

Alguns processos que visam à preservação dos alimentos envolvem o aquecimento e o resfriamento (CULBERTSON et al., 2005). Estes processos podem causar a desnaturação das proteínas e influenciar na sua capacidade antigênica (CULBERTSON et al., 2005). Tipicamente, a maioria das proteínas sofre desnaturação térmica a temperaturas elevadas, no entanto, algumas podem sofrer desnaturação pelo frio em temperaturas inferiores a temperatura ambiente, como é o caso da mioglobina (CULBERTSON et al., 2005).

Segundo CULBERTSON et al. (2005), o mecanismo de desnaturação induzida pela temperatura envolve principalmente o efeito da temperatura sobre a estabilidade de interações não covalentes. Dessa forma, as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, que são de natureza exotérmica, são desestabilizadas, enquanto interações hidrofóbicas, de natureza endotérmicas, são estabilizadas com o aumento da temperatura. Para MONACI et al. (2006), esse processo pode ser dar de forma irreversível ou reversível.

Fatores externos como pH, concentração de proteína, conteúdo de sólidos totais e presença de açúcar atuam sobre as interações nativas da estrutura da proteína e podem influenciar na desnaturação das proteínas do leite (CULBERTSON et al., 2005; MONACI et al., 2006).

Os solutos de pequeno peso molecular, tais como sais e açúcares, afetam a temperatura de desnaturação de proteínas (CULBERTSON et al., 2005).

As caseínas são relatadas como o grupo de proteínas mais termoestáveis, enquanto as  $\beta$ LG são descritas com comportamento termolábil (WEGRZYN et al., 2008). No entanto, por interação com as caseínas, a  $\beta$ LG pode ter seu comportamento termolábil diminuído (MONACI et al., 2006).

Ao utilizar métodos de ressonância magnética nuclear (RMN) para estudar a desnaturação térmica de proteínas, foram descritas como temperaturas de desnaturação de  $\beta$ LG e  $\alpha$ LA as faixas compreendidas entre 70,5 °C e 81,5 °C e entre 58,6 °C e 61,0 °C, respectivamente (GOETZ & KOEHLER, 2005). Após dez minutos de aquecimento a 100 °C, foi observado, em estudo conduzido por WEGRZYN et al. (2008), uma redução significativa da alergenicidade das proteínas do leite.

DOWNS & TAYLOR (2010), avaliaram o efeito do processamento térmico na detecção de resíduos de leite em massa folheada, por três kits de ELISA comerciais, para proteínas totais, caseína e  $\beta$ LG. Os pesquisadores utilizaram diferentes condições de processamento térmico (cozimento a 100 °C por 2 minutos, assamento a 190 °C por 30 minutos, fritura a 190 °C por 2 minutos, autoclavagem a 121 °C por 20 minutos e massa crua) e concentrações de leite em pó desnatado (0, 10, 25, 50, 100 e 250 mg/kg). Observou-se que a  $\beta$ LG foi a fração de proteína que teve maiores perdas após os tratamentos térmicos, seguida da caseína e das proteínas totais. Em relação aos diferentes processamentos térmicos, a fritura gerou maior degradação das proteínas totais do leite, seguida do assamento e cozimento. Caseína e  $\beta$ LG foram mais degradadas quando as amostras foram assadas, fritas e cozidas.

MONACI et al. (2011) investigaram a influência do tempo de assamento na detecção de proteínas alergênicas do leite em biscoitos do tipo cookie, por quatro kits de ELISA comerciais, sendo um para proteínas totais, um para caseína e dois para lactoglobulinas. Amostras incorporadas com leite antes de assadas e adicionadas de leite após o processamento foram estudadas. Os pesquisadores avaliaram os teores de alergênicos antes e após o tratamento térmico (180 °C por 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos), observando diminuição nos teores de todas as proteínas estudadas com o aumento do tempo de assamento. Assim como na pesquisa de DOWNS & TAYLOR (2010),

a  $\beta$ LG se comportou de forma mais instável quando comparada à caseína exposta ao tratamento térmico.

KHUDA et al. (2012) também avaliaram o efeito do processamento na determinação de alergênicos por kits imunológicos comerciais. Foram elaborados biscoitos do tipo *cookie* adicionados de material de referência certificado (MRC) de farinha de amendoim torrado (Golden Peanut Co., Alpharetta 521271), de ovo em pó integral (NIST RM 8445) e de leite em pó desnatado (NIST SRM 1549), assados a 190 °C durante 25 e 30 minutos. Todos os kits estudados apresentaram menor recuperação dos alérgenos após o assamento. O aumento do coeficiente de variação foi proporcional ao tempo de assamento dos biscoitos. Desta forma, os autores concluíram que o processamento afetou negativamente a recuperação e a precisão dos métodos ELISA para detecção de amendoim, ovo e leite em biscoitos.

No estudo de BLOOM et al. (2014) as cadeias de caseína se mantiveram estáveis após aquecimento a 90 °C por 60 minutos, já as proteínas do soro  $\alpha$ LA e  $\beta$ LG foram degradadas após 15 a 20 minutos nesta mesma temperatura.

Ainda são restritos na literatura os estudos sobre a influência do tratamento térmico na alergenicidade e tolerogenicidade de proteínas alergênicas (WATANABE et al., 2014).

BU et al. (2009) avaliaram os efeitos do calor sobre a antigenicidade de proteínas do leite, *in vitro*, por método imunoenzimático (ELISA competitivo indireto). Amostras de *whey protein* isolado foram aquecidas em temperatura de 50 °C a 120 °C por 20 minutos. Os autores evidenciaram aumento da antigenicidade de  $\beta$ LG e  $\alpha$ LA com aumento da temperatura de 50°C para 90°C, antigenicidade máxima foi alcançada a 90°C e, a partir de 120°C, houve queda da antigenidade, para ambas proteínas estudadas, mas que se mantiveram acima dos valores obtidos para amostras sem tratamento térmico.

Estudo clínico de FIOCCHI et al. (1998) envolvendo treze crianças com hipersensibilidade à carne, evidenciou que os tratamentos térmicos (103 °C e 98 °C por 20 minutos para bife e 100 °C por 5 minutos para BSA) diminuíram a sensibilização alérgica em teste cutâneo, mas sem significância estatística. SOUZA & ROSARIO (2012) argumentaram que o processamento industrial,

como pasteurização e altas temperaturas, pode reduzir minimamente o potencial alergênico dessas proteínas.

KLEBER et al. (2004) observaram aumento da antigenicidade da  $\beta$ LG tratada termicamente a 90 °C, sendo que o tempo de aquecimento foi determinante na indução da resposta antigênica, que foi mais elevada após 35 minutos de tratamento. Nesses casos, o aumento da antigenicidade foi associado à maior exposição de epítomos intramoleculares devido ao desdobramento da cadeia polipeptídica, ou mesmo à formação de novos sítios antigênicos. Por outro lado, o tratamento sob temperatura mais elevada (148 °C) resultou na redução da antigenicidade da  $\beta$ LG, que foi associada ao processo de agregação com rearranjos inter e intramoleculares e consequente ocultamento de vários epítomos (KLEBER et al., 2004).

O leite bovino contém lactose e outros açúcares redutores e, portanto, está sujeito à reação de Maillard ou glicação durante o tratamento térmico (NAKAMURA et al., 2005; KAFRANI et al., 2009). A glicação é uma das modificações químicas mais frequentemente observadas no processamento industrial (NAKAMURA et al., 2005; KAFRANI et al., 2009). Tal processo resulta na formação de compostos intermediários, denominados produtos de Amadori, os quais podem tanto aumentar a atividade de ligação de IgE, como reduzir ou não afetar o seu reconhecimento, conforme a reatividade dos açúcares presentes na reação (NAKAMURA et al., 2005; KAFRANI et al., 2009).

### 3.3 REGULAMENTAÇÃO PARA ALIMENTOS ALERGÊNICOS

A restrição do consumo de alimentos alergênicos é a única alternativa disponível para prevenir o aparecimento das complicações clínicas, de forma que o acesso a informações adequadas sobre a presença de alérgenos nos alimentos é essencial para proteger a saúde de indivíduos com alergias alimentares. Na maioria dos alimentos embalados, a rotulagem é o principal meio de comunicação pelo qual os fabricantes podem informar os consumidores sobre a presença de alergênicos, permitindo o gerenciamento do risco de manifestações clínicas adversas (BRASIL, 2015b).

A presença de alérgenos não declarados nos alimentos representa um perigo potencial para a saúde (VIERK et al., 2002). Desta forma, rótulos com informações claras e precisas sobre a composição dos alimentos são fundamentais para que os consumidores alérgicos identifiquem a presença de constituintes que podem causar complicações clínicas e evitem seu consumo (BRASIL, 2013).

### 3.3.1 Legislação

Nos EUA, a declaração de alergênicos nos rótulos de todos os alimentos embalados é regulamentada pelo FDA, que em 1996 estabeleceu a declaração de alergênicos nos rótulos como voluntária. No ano de 2004 foi publicado FALCPA, no entanto, a rotulagem de alergênicos só se tornou obrigatória em 2006, com obrigatoriedade de declaração de oito alérgenos comuns em alimentos, incluindo leite, ovos, peixes, mariscos e crustáceos, nozes, amendoim, trigo e soja (FDA, 2013).

No Japão, em 2002, a declaração de alergênicos no sistema de rotulagem de alimentos se tornou obrigatória. Esse foi o primeiro país a estabelecer uma lei para rotulagem obrigatória de alergênicos. Sete alérgenos, incluindo leite, ovos, trigo, trigo sarraceno, amendoim, caranguejo e camarão devem obrigatoriamente ser rotulados no referido país (AKIYAMA et al., 2011).

Na Europa, a regulamentação deste tema ocorreu em 2007, por meio da Diretiva 2007/68/EC, que tratou a declaração de ingredientes considerados alergênicos em alimentos comercializados. No total, treze alimentos alergênicos devem ser declarados, sendo leite, ovos, trigo, amendoim, peixes, crustáceos, soja, castanhas, gergelim, frutos do mar, mostarda, aipo e tremoço (UE, 2000).

No Brasil, a rotulagem de alimentos alergênicos foi recentemente regulamentada pela ANVISA e teve participação ativa da população na sua formulação. Em maio de 2014, foi aprovada a Consulta Pública (CP) nº29/2014 acerca da proposta de regulamentação da RDC que dispõe sobre Rotulagem de Alergênicos em Alimentos, com a finalidade de submeter o assunto para debate do público em geral (BRASIL, 2013). A CP teve expressiva participação



social, totalizando 3.531 participantes os quais enviaram 5.475 contribuições. Dessas propostas, 96,5 % foram de pessoas físicas, demonstrando a relevância regulatória da matéria (BRASIL, 2014c). No entanto, não foi recebida nenhuma contribuição em relação às questões metodológicas envolvidas na detecção e quantificação de alergênicos (BRASIL, 2014c). Tais questões são essenciais para fiscalização da normativa e podendo afetar a implantação da regulamentação.

Após aproximadamente um ano da realização da CP, a ANVISA convidou cidadãos, representantes da sociedade civil e do setor regulado e realizou uma Audiência Pública, com o objetivo de apresentar as alterações realizadas na proposta de regulamentação de alergênicos. Então, em julho de 2015 foi publicada a RDC nº 26/2015, que dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória, no país, dos principais alimentos que causam alergias alimentares (BRASIL, 2015a). Esta Resolução se aplica as bebidas, ingredientes, aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia embalados na ausência dos consumidores, incluindo os produtos destinados exclusivamente ao processamento industrial e os destinados aos serviços de alimentação. Não foram incluídos no escopo da referida legislação os alimentos embalados preparados ou fracionados em serviços de alimentação e comercializados no próprio estabelecimento, alimentos embalados nos pontos de vendas a pedido do consumidor e alimentos comercializados sem embalagens (BRASIL, 2015a).

Os alérgenos que devem ser declarados incluem trigo, centeio, cevada, aveia e suas estipes hibridizadas, crustáceos, ovos, peixes, amendoim, soja, leite, castanhas, amêndoa (*Prunus dulcis*), avelã (*Corylus avellana*), castanha de caju (*Anacardium occidentale*), castanha do Brasil ou castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), nozes (*Juglans regia* L), pecãs (*Carya illinoensis*), pistache (*Pistacia vera*), pinoli (*Pinus pinea*), e látex natural (BRASIL, 2015a).

As declarações dos alimentos alergênicos tem a finalidade de informar ao consumidor a presença de ingredientes que devem ter seu consumo restringido. Entretanto, as regras para declaração da lista de ingredientes possuem diversas limitações que diminuem a efetividade das informações transmitidas para o manejo das alergias alimentares (BRASIL, 2013).

Uma das limitações citadas pela ANVISA é a declaração dos nomes dos ingredientes por meio do emprego de terminologias técnicas ou científicas que não descrevem sua origem (BRASIL, 2013). Por exemplo, termos como caseína,  $\beta$ LG, albumina, embora adequados do ponto de vista técnico, não informam ao consumidor com clareza que esses ingredientes são derivados do leite e do ovo, respectivamente (BRASIL, 2013).

Dessa forma, a RDC nº 26/2015 determina que se declare nos rótulos o nome comum do alimento alergênico. Os alimentos, ingredientes, aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia que contenham ou que sejam derivados dos alergênicos listados na referida Resolução devem trazer a declaração "Alérgicos: Contém (nomes comuns dos alimentos que causam alergias alimentares)" ou "Alérgicos: Contém derivados de (nomes comuns dos alimentos que causam alergias alimentares)" ou "Alérgicos: Contém (nomes comuns dos alimentos que causam alergias alimentares) e derivados" (BRASIL, 2015a).

Nos casos em que não for possível garantir a ausência de contaminação cruzada dos alimentos, ingredientes, aditivos alimentares ou coadjuvantes de tecnologia por alérgenos alimentares, os rótulos deverão constar da seguinte declaração "Alérgicos: Pode conter (nomes comuns dos alimentos que causam alergias alimentares)" (BRASIL, 2015a). Sendo aplicável ao produto mais de uma das advertências previstas na resolução, a informação deve ser agrupada em uma única frase, iniciada pela expressão "Alérgicos" seguida das respectivas indicações de conteúdo (BRASIL, 2015a).

Segundo ASBAI (2008), é importante ressaltar a dificuldade dos consumidores reconhecerem corretamente nos rótulos dos produtos industrializados as fontes de proteínas alergênicas, e essa dificuldade se torna uma forma de transgressão não intencional à dieta de exclusão. SIMONS et al. (2005) relataram que 16 % das reações alérgicas durante a dieta de exclusão ocorrem em função do não entendimento de um termo listado entre os ingredientes e 22 % ocorrem pela presença de componentes alergênicos não listados nos rótulos.

VIERK et al. (2002) analisaram dados sobre *recalls* realizados no ano de 1999 pelo FDA nos EUA, envolvendo alimentos comercializados contendo

alérgenos não declarados. Dentre os 659 produtos analisados, 236 (36 %) foram recolhidos por conter um ou mais alérgeno não declarado e destes 15 % eram produtos de panificação. Omissão de ingrediente alergênico (51 %), contaminação cruzada durante o processamento (40 %) e erros por parte do fornecedor de ingredientes ou empregados da indústria (5 %) foram as principais não conformidades (NC) encontradas.

Apesar do avanço da rotulagem de alérgenos nos EUA, dados do FDA demonstraram que em quatro anos houve aumento do número de alimentos comercializados sem declaração de alergênicos. Os produtos de panificação, como biscoitos e bolos foram os alimentos mais frequentemente encontrados com inadequações, representando 30,5 % dos produtos analisados (FDA, 2006; FDA, 2013). Dentre os ingredientes alergênicos, o leite foi o principal alergênico não declarado (FDA, 2006; FDA, 2013).

SHETH et al. (2010) avaliaram os fatores envolvidos na exposição acidental a alimentos alergênicos no Canadá. Os problemas na rotulagem de alimentos foi um fator de destaque no estudo. Alérgeno não descrito no idioma oficial; erro de tradução; alérgeno declarado, mas sem clareza e visibilidade adequada; ausência da declaração do alérgeno; e alimentos com contaminação cruzada foram observados como os principais fatores envolvidos na exposição acidental.

### 3.3.2 Métodos de análise

Com a finalidade de assegurar o cumprimento da rotulagem de alergênicos em alimentos e aumentar a proteção ao consumidor, é preciso realizar ações de controle e monitoramento da qualidade e segurança alimentar (POMS et al., 2004) por meio da detecção das proteínas alergênicas.

A escolha do método depende do alergênico a ser detectado, da matriz alimentar e dos processos tecnológicos empregados na produção do alimento (MURARO et al., 2014). As proteínas alergênicas interagem com outros componentes alimentares e modificações conformacionais e químicas, devidas ao processamento de alimentos, afetam sua extração e detecção (DIAZ-AMIGO, 2010; DIAZ-AMIGO & POPPING, 2010; MURARO et al., 2014). Dessa

forma, dados sobre mudanças no potencial alergênico das proteínas são relevantes para avaliação de risco do alérgeno na produção de alimentos, mas também para o desenvolvimento de metodologias para detecção dessas substâncias (MURARO et al., 2014).

As técnicas usualmente utilizadas para detecção de alérgenos em alimentos são imunológicas, cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (MS) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (POMS et al., 2004; DIAZ-AMIGO, 2010). COSTA et al. (2012) estimaram que os métodos usados na detecção de alérgenos em alimentos devem atingir limites de detecção próximos a 1-100 mg/kg, que correspondem a uma faixa de concentração baixa para grande parte das técnicas disponíveis.

Segundo BENITES (2016), os métodos físicos químicos de separação de proteínas, como a cromatografia acoplada à MS é a técnica mais recomendada para identificar as proteínas alergênicas em alimentos. Possui elevada sensibilidade e especificidade, permite efetuar, em simultâneo, a detecção, quantificação e a identificação de múltiplos alérgenos em uma única análise (COSTA et al., 2012; BENITES, 2016). Além disto, fornece resultados precisos, pois identifica os alérgenos com base na sequência de aminoácidos, de forma que alterações na estrutura das proteínas não interferem na sua identificação (MONACI & VISCONTI, 2009; MELO, 2011). No entanto, alguns autores (MELO, 2011; COSTA et al., 2012) relataram que essa técnica possui elevada complexidade na sua execução, necessidade de aquisição de equipamentos de alto custo e de pessoal treinado e altamente capacitado.

As técnicas baseadas na detecção do ácido desoxirribonucleico (DNA), como a PCR, é um método de biologia molecular capaz de amplificar o gene codificante da proteína alergênica, tornando possível sua identificação (MELO, 2011; RIDLEY, 2015). Segundo COSTA et al. (2012), na técnica de PCR, as cadeias duplas de DNA são separadas por desnaturação em temperatura de 94 a 96 °C, seguido da hibridização dos *primers*, que se ligam aos locais complementares de cada uma das cadeias alvo na temperatura de 50 a 65 °C e de respectiva amplificação termoresistente a 72 °C, obtendo-se, ao final de 30 ciclos de amplificação, mais de 10<sup>9</sup> fragmentos de DNA. Esta técnica possui elevada sensibilidade e especificidade, além de ser relativamente simples e

rápida (COSTA et al., 2012). Ademais, as moléculas de DNA evidenciam maior estabilidade do que as proteínas e a PCR se torna útil em alimentos com elevado grau de processamento (COSTA et al., 2012). Dentre suas limitações estão o elevado preço dos equipamentos e o fato da presença de DNA não ter necessariamente relação direta com a quantidade de alérgeno no alimento (COSTA et al., 2012).

Os imunoenaios tipicamente utilizam anticorpos para detecção de proteínas alergênicas específicas (MONACI & VISCONTI, 2010). Diferentes classes de anticorpos podem ser utilizados contra proteínas alergênicas, incluindo anticorpos monoclonais e policlonais. Os anticorpos monoclonais são adequados para a detecção de um alérgeno por meio do reconhecimento de um epítopo, já os policlonais reconhecem múltiplos epítopos de um alérgeno (MONACI & VISCONTI, 2010). Tais características tornam as técnicas monoclonais mais seletivas e menos sensíveis quando comparadas às policlonais.

Na detecção imunoquímica de alérgenos as principais técnicas envolvidas são *Radio Allergosorbent Test* (RAST), *Enzyme Allergosorbent Test* (EAST), *Rocket Immuno Electrophoresis* (RIE), *Immunoblotting* e ELISA (POMS et al., 2004).

Segundo VAZ (2007), os ensaios imunoenzimáticos são técnicas que permitem medidas quantitativas diretas da interação antígeno-anticorpo por medida da atividade enzimática sobre um substrato. Para esse autor, a enzima utilizada no ensaio deve apresentar elevada especificidade e pureza, estabilidade, custo acessível, ter conjugação fácil a antígenos, anticorpos e haptenos sem o comprometimento da atividade e nem interferência na conformação espacial dos sítios ativos da molécula (VAZ, 2007). O produto da reação deve ser estável com o substrato, de fácil quantificação, com alta absorvidade molar e que facilite a detecção da presença de pequenas quantidades de enzima (VAZ, 2007). Os substratos cromogênicos devem ser estáveis, atóxicos, de baixo custo, e produzir uma substância solúvel de cor mensurável ou visível (VAZ, 2007).

A técnica de ELISA foi desenvolvida na década de 1970, sendo difundida comercialmente a partir de 1985 como o ensaio para anticorpos anti-

HIV (VAZ, 2007). A referida técnica se baseia na imobilização de um dos componentes, antígeno ou anticorpo, em fase sólida, e na utilização de um conjugado, que também pode ser antígeno ou imunoglobulina, ligado a uma enzima, com a preservação da atividade enzimática e imunológica. Essa reação origina um produto colorido, e a alteração da cor é monitorada visualmente ou por meio de espectrofotômetro, determinando a relação entre a intensidade da cor e a quantidade do analito pesquisado na amostra (VAZ, 2007).

Algumas vantagens atribuídas à técnica de ELISA são descritas na literatura e incluem facilidade de execução, rapidez, baixo custo, elevadas sensibilidade e seletividade, baixos limites de detecção e possibilidade de adaptações a diferentes graus de automação (MONACI et al., 2010). No entanto, esta técnica possui limitações como séries de concentrações estreitas, volumes limitados de amostras, em alguns casos, provê apenas dados semiquantitativos e é susceptível à reatividade cruzada com proteínas não alvo (MONACI et al., 2010; COSTA et al., 2012).

Ademais, a técnica de ELISA é usada por órgãos reguladores oficiais e pelas indústrias para detecção de alérgenos em alimentos (POMS et al., 2004; DIAZ-AMIGO, 2010). No Japão, kits de ELISA foram desenvolvidos e submetidos a estudos de validação interlaboratoriais, sendo usados pelos centros de saúde pública como método oficial para monitoramento da rotulagem de alergênicos (SHIGEKI et al., 2015).

Para detecção de alérgenos, dois tipos de ELISA têm sido empregados, o competitivo e o “sanduiche” (POMS et al., 2004).

No ELISA competitivo, o método de competição com antígeno marcado utiliza reagentes em quantidades limitadas (VAZ, 2007). O anticorpo utilizado deve ligar com a mesma avidéz ao antígeno da amostra e ao antígeno marcado (VAZ, 2007). O resultado positivo resulta no desenvolvimento mínimo ou ausência de coloração, pois a quantidade de antígeno conjugado com a enzima que se ligou ao anticorpo da fase sólida é inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra (VAZ, 2007).

Já o ELISA “sanduiche”, envolve um anticorpo de captura imobilizado em uma fase sólida que geralmente é uma placa de microtitulação (POMS et

al., 2004) . Proteínas específicas na amostra são capturadas pelo primeiro anticorpo e detectadas por um segundo anticorpo marcado com uma enzima específica, que se liga ao analito formando um “sanduiche” (POMS et al., 2004). Ao adicionar um substrato cromógeno, ocorre uma reação colorimétrica com a enzima do anticorpo marcado que pode ser medida por espectrofotometria (MONACI et al., 2006). A medida da absorção será diretamente proporcional à concentração do analito na amostra (POMS et al., 2004).

Estão disponíveis no mercado kits de ELISA com desempenho variável e limitações metodológicas. Estes podem diferir na especificidade do anticorpo, nos métodos de calibração, na composição dos tampões de extração, no procedimento analítico e na expressão dos resultados (KHUDA et al., 2012).

Segundo POMS et al. (2004), a detecção de alergênicos em produtos alimentares é difícil e dependente de características de desempenho como sensibilidade e seletividade, uma vez que, frequentemente, as substâncias alergênicas estão presentes em quantidades traços e podem ser mascaradas pela matriz alimentar. O LD se caracteriza também como um parâmetro de desempenho crítico para os métodos de detecção de alérgenos, já que existem poucos dados estabelecendo limites seguros determinados por estudos de provocação oral em humanos (POMS et al., 2004).

O limite de segurança de alergênicos (*threshold*) é a menor dose de determinado alergênico capaz de produzir efeitos objetivos em indivíduos altamente sensíveis (MONACI et al., 2006). Contudo, MONACI et al.(2006) descrevem que não existem dados suficientes para a definição de doses limites que resultariam em uma resposta alérgica em uma determinada proporção da população.

São citadas em trabalho MONACI et al. (2006) pelo menos quatro abordagens que poderiam ser empregadas para definir os limites de alergênicos, incluindo métodos analíticos, avaliação de risco e de segurança e legislações. Segundo esses autores, as melhores estimativas de doses limite para vários alimentos alergênicos podem ser obtidas a partir de ensaios clínicos controlados ainda restritos.

BINDSLEY-JENSEN et al. (2002) desenvolveram um modelo estatístico visando estabelecer doses limites de alimentos, incluindo leite, ovo, amendoim e soja, que induziriam reações alérgicas em pacientes sensíveis, com base em dados da literatura. De 414 publicações, 25 artigos foram selecionados tendo como critério a disponibilidade de dados de dose-resposta e número de pacientes. As doses preditas e limites de confiança inferiores calculados para alérgenos do leite foram de  $5,9 \times 10^{-4}$  mg e  $7,1 \times 10^{-5}$  mg para a taxa de resposta de 1:1.000.000 e de 0,87 mg e 0,28 mg para a taxa de resposta de 1:100, respectivamente.

No Japão foi estabelecido, em conjunto com a indústria, varejo, institutos de pesquisa pública e privada e universidades, o limiar para rotulagem de alérgenos de 10 µg de proteína solúvel/g de ingrediente alimentar, equivalente a 10 mg/kg, determinado por método quantitativo de detecção (SAKAI et al., 2013). Segundo SAKAI et al. (2013), esse nível é o mínimo requerido para controle de ingredientes alergênicos usando métodos em escala industrial.

ALLEN et al. (2014) também propuseram modelos para estimativa de doses limites para aipo, amendoim, avelã, caju, camarão, leite, mostarda, ovo, peixe, sementes de gergelim, soja, tremoço e trigo. Foram selecionadas 60 publicações e todas as doses estimadas foram normalizadas com base na fonte de proteína do alergênico, sendo o limite calculado para leite equivalente a 0,1 mg de proteínas.

O estabelecimento de um limite seria relevante para as autoridades regulatórias, podendo se tornar referência para excetuar ingredientes da declaração e para alegação de “não contém”. Na indústria de alimentos, melhoraria o controle da produção e o uso mais adequado da rotulagem de advertência; e para os indivíduos com alergia, melhoraria o gerenciamento dos efeitos adversos (BRASIL, 2014a).

Entretanto, não existe consenso sobre a possibilidade de estabelecer tais limites com fundamento científico adequado, devido às limitações metodológicas, grande variabilidade intra e inter individuais, impacto do processamento no potencial alergênico e reações cruzadas (BRASIL, 2014a).

Dessa forma, o desempenho dos métodos de análise torna-se crucial para a implementação de ações de controle visando à segurança na ingestão



de alimentos por alérgicos por todos os envolvidos nesta cadeia produtiva (KERBACH et al., 2009). Além da confiabilidade, os métodos devem ser fáceis, ter um bom custo benefício e ser aplicáveis a diferentes alimentos processados, com variadas composições (KERBACH et al., 2009).

### 3.3.2.1 *Validação*

A validação de métodos é uma importante ferramenta compreendida nos sistemas de gestão da qualidade (SGQ) laboratoriais que, juntamente com procedimentos de controle de qualidade interno e externo, permite aos laboratórios produzirem dados analíticos confiáveis (THOMPSON, et al., 2002; SOUZA, 2007). É definida como a confirmação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para um uso pretendido são atendidos (ABNT, 2005; SOUZA, 2007; GONDIM, 2012; INMETRO, 2012).

Um método deve ser validado, quando é necessário demonstrar que o seu desempenho e características são adequados para o uso em um propósito particular (ABNT, 2005). A ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 sugere que os métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram desenvolvidos, ampliados ou modificados; métodos não normalizados; e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados (ABNT, 2005; SOUZA, 2007; GONDIM, 2012).

As validações podem ser estruturadas em processos inter e intralaboratoriais (SOUZA, 2007; GONDIM, 2012). A validação intralaboratorial corresponde a um estudo analítico que envolve um único laboratório, utilizando um mesmo método de ensaio, para analisar a mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em curtos intervalos de tempo (EC, 2002). É indicada para garantir a viabilidade do método antes de um ensaio interlaboratorial ou fornecer evidências de confiabilidade quando estudos interlaboratoriais não forem disponíveis ou praticáveis (SOUZA, 2007). Tal forma de validação é flexível e hábil em fornecer resultados rápidos para novos métodos, facilmente adaptáveis às diferentes situações e possibilitam avaliar o desempenho de métodos com um número considerável de experimentos, utilizando distintas

combinações, concentrações e matrizes de analitos, em um curto intervalo de tempo (EC, 2002; SOUZA, 2007).

A validação intralaboratorial permite a avaliação de diferentes parâmetros de desempenho, com exceção da precisão sob condições de reprodutibilidade (SOUZA, 2007). Apesar da impossibilidade de estudar o referido parâmetro, que exige a execução de experimentos em diferentes laboratórios, muitas vezes o estudo da precisão intermediária é suficiente (EURACHEM, 1998; SOUZA, 2007; MAGNUSSON, 2014).

As validações intralaboratoriais devem ser representativas, fornecendo um levantamento real do número e faixa de efeitos operacionais, analitos, faixas de concentração e matrizes possíveis de ocorrerem nas condições de uso do método (THOMPSON et al., 2002; SOUZA, 2007). As replicatas devem ser delineadas, sempre que possível, considerando a importância das replicatas verdadeiras e não somente replicatas de leitura, a fim de conhecer a variabilidade real e não a variabilidade mínima dos resultados (EURACHEM, 1998; SOUZA, 2007; MAGNUSSON, 2014).

#### *Parâmetros de desempenho de métodos quantitativos*

Os parâmetros de desempenho típicos na validação intralaboratorial de métodos de ensaio quantitativos são: linearidade (para métodos que empregam curvas de calibração), faixa de linear e de trabalho, sensibilidade, seletividade, veracidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), LD e limite de quantificação, incerteza de medição e robustez (SOUZA, 2007; MAGNUSSON, 2014).

“A calibração estabelece, sob condições específicas, em uma primeira etapa, a relação entre os valores e as incertezas de medição fornecidos por padrões e as indicações correspondentes com as incertezas associadas; em uma segunda etapa, utiliza esta informação para propor uma relação visando um resultado de medição a partir de uma resposta” (INMETRO, 2012). A linearidade e faixa linear, que expressam a faixa na qual o sinal analítico é linearmente proporcional à sua concentração, são parâmetros avaliados em métodos que empregam recurso de curva de calibração, embora no caso de

kits comerciais, os padrões e modelos são previamente validados e fornecidos pelos fabricantes (EURACHEM, 1998; SOUZA, 2007).

A sensibilidade, em métodos quantitativos, corresponde ao gradiente de uma função de calibração, sendo usualmente arbitrário e dependente de ajustes instrumentais (EURACHEM, 1998; THOMPSON et al., 2002).

A seletividade é a habilidade de um método em determinar o analito, acuradamente, na presença de interferentes (THOMPSON et al., 2002; MAGNUSSON, 2014). Em análise de alimentos, na qual as matrizes analisadas são constituídas por substâncias químicas complexas, a seletividade se torna um parâmetro da validação de grande importância (SOUZA, 2007).

A veracidade é estabelecida pelo INMETRO (2012) como o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência. Este parâmetro pode ser avaliado por experimentos com MRC, materiais de referência (MR), métodos de referência ou experimentos de recuperação (THOMPSON et al., 2002). Segundo THOMPSON et al. (2002) a recuperação é expressa como “ a diferença entre o resultado da análise de um material adicionado de concentração conhecida do analito e valor de referência do material em seu estado original”. COMPANYÓ et al. (2009) descrevem que a extração realizada em uma amostra e as separações envolvidas nesse processo podem ocasionar em perdas do analito e, conseqüentemente, o analito presente na solução a ser medida será inferior a amostra original. THOMPSON et al. (2002) ressaltam que uma adequada recuperação não é garantia de veracidade, mas uma recuperação inadequada indica falta de veracidade.

Precisão diz respeito à distribuição de erros aleatórios de um sistema de medição (EURACHEM,1998). É o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições pré-estabelecidas (EURACHEM,1998). O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão, o qual pode ser estimado por meio do desvio padrão (DP) do resultado do ensaio (EURACHEM, 1998; EC, 2002; THOMPSON et al., 2002; MAGNUSSON E ÖRNEMARK, 2014).

As três condições mais comuns de avaliação da precisão são repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (EURACHEM,1998;

EC, 2002; SOUZA, 2007). A repetibilidade é caracterizada por uma condição de estudo da precisão na qual os resultados independentes são obtidos pelo emprego do mesmo método, em um mesmo laboratório, com o mesmo analista, mesmo equipamento e em um curto intervalo de tempo, ou seja, mesma bateria analítica (EURACHEM, 1998; THOMPSON et al., 2002; SOUZA, 2007). A reprodutibilidade representa a condição de estudo da precisão quando resultados são obtidos utilizando o mesmo método, em laboratórios diferentes, mas empregando diferentes analistas e equipamentos. A precisão intermediária se refere à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando condições como analistas, equipamentos e tempo ou baterias analíticas (EURACHEM, 1998; THOMPSON et al., 2002; SOUZA, 2007). A precisão, tanto sob condições de repetibilidade quanto de reprodutibilidade é dependente da concentração do analito (EURACHEM, 1998; THOMPSON et al., 2002; SOUZA, 2007).

A habilidade em detectar um composto presente na amostra, mesmo em concentrações extremamente baixas, é relacionada aos limites LD e limite de quantificação (LQ) (EC, 2002). O LD é a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser significativamente distinguida de zero. Esse limite corresponde à média mais três DP das respostas obtidas para as amostras brancas ou de concentração baixa do analito (THOMPSON et al., 2002; SOUZA, 2007). O LQ, por sua vez, corresponde a menor concentração de uma substância que pode ser quantificada com precisão aceitável nas condições estipuladas do teste (EC, 2002). Esse limite corresponde à média mais dez DP das respostas obtidas para as amostras brancas ou de concentração baixa do analito (THOMPSON et al., 2002; SOUZA, 2007).

A incerteza é um indicador chave tanto da adequação para uso de um método quanto da confiabilidade dos resultados analíticos obtidos em laboratório (TAVENIERS et al., 2004). Segundo o INMETRO (2012), esse parâmetro se caracteriza como a dispersão dos valores atribuídos a um analito mensurado, inclui componentes provenientes de efeitos sistemáticos que podem ser corrigidos ou acompanhados de sua incerteza de medição associada.

O estudo da robustez serve para avaliar a susceptibilidade de um método às alterações das condições experimentais descritas no procedimento, por meio da introdução deliberada de variações da observação de suas consequências, em relação às condições experimentais que possam estar sujeitas às variações (EC, 2002; THOMPSON et al., 2002; SOUZA, 2007). Dessa forma, as variáveis responsáveis por efeitos significativos podem ser identificadas e controladas, durante a execução da análise (COELHO, 2016).

#### *Parâmetros de desempenho de métodos qualitativos*

Os parâmetros de desempenho para validação intralaboratorial de métodos de ensaio qualitativos são: taxas de falsos-negativos (TFN), taxas de falsos-positivos (TFP), taxa de sensibilidade (TSB), taxa de seletividade (TST), taxa de confiabilidade (TCF), LD, região de perda da confiabilidade (RPC), acordância (ACO) e concordância (CON), além da robustez. Este tipo de validação fornece muito menos informações que os métodos quantitativos, requerendo, assim, um número significativo de medidas para se obter resultados com a mesma significância e certeza que os resultados obtidos de métodos quantitativos (GONDIM et al., 2014).

A TFP é a probabilidade de obter um resultado positivo, uma vez que o analito não está presente na amostra. Analogamente, a TFN constitui a probabilidade de obtenção de um resultado negativo quando a substância está presente na amostra. Portanto, a confiabilidade de um método qualitativo é definida como a proporção de resultados corretos (positivos ou negativos) de uma bateria de testes independentes, de forma que a TCF é calculada como o total de resultados (100 %) subtraído das taxas de falsos resultados. Tais parâmetros têm correspondência com a veracidade em análises quantitativas (GONDIM et al., 2011; GONDIM, 2012).

As TSB e TST são parâmetros de desempenho de métodos qualitativos intimamente relacionados com as taxas de falsos resultados (GONDIM et al., 2011; GONDIM, 2012). Segundo GONDIM et al. (2011), a sensibilidade, também chamada de poder do teste, consiste na habilidade do método em detectar amostras verdadeiramente positivas como positivas. Então, a TSB corresponde à probabilidade de um método classificar como positiva uma

amostra sabidamente positiva. Já a seletividade corresponde à habilidade em detectar amostras verdadeiramente negativas como negativas, sendo a TST a probabilidade de classificar como negativa uma amostra sabidamente negativa (GONDIM et al., 2011; GONDIM, 2012).

Sabe-se que nas análises qualitativas, a incerteza não pode ser expressa como nas análises quantitativas (GONDIM et al., 2011; GONDIM, 2012). Nos métodos qualitativos, a incerteza tem uma natureza probabilística, e pode ser definida como a probabilidade de se tomar uma decisão errada (GONDIM et al., 2011; GONDIM, 2012). Desta maneira, o conceito clássico de incerteza pode ser substituído pelo conceito de RPC, a qual é definida pelos limites superiores e inferiores de concentração, entre os quais o método produz resultados falsos (GONDIM et al., 2011; GONDIM, 2012).

O LD pode ser calculado como o limite inferior ou superior da RPC dependendo do tipo de erro,  $\alpha$  ou  $\beta$ , considerado (GONDIM, 2012; GONDIM et al., 2014).

A ACO e CON compreendem parâmetros correspondentes à precisão em ensaios qualitativos, sob condições de repetibilidade e de reprodutibilidade, respectivamente (GONDIM et al., 2011; GONDIM, 2012). ACO consiste na probabilidade de se obter, para amostras idênticas quando analisadas em um mesmo laboratório, sob condições de repetibilidade, o mesmo resultado. CON representa a probabilidade de obtenção do mesmo resultado para amostras idênticas, testadas em laboratórios diferentes, sob condições de reprodutibilidade ou precisão intermediária (GONDIM et al., 2011; GONDIM, 2012).

Segundo GONDIM et al. (2011) e GONDIM (2012), a robustez em análise qualitativa é um parâmetro analítico, assim como nas análises quantitativas, cujo objetivo é definir as fragilidades experimentais de um método pela indicação das variáveis críticas na garantia da confiabilidade das respostas.

### 3.4 BISCOITOS

Biscoitos ou bolachas são os produtos obtidos pela mistura de farinhas, amidos e ou fécula com outros ingredientes, submetidos a processos de amassamento e cocção, fermentados ou não. Podem apresentar diversas coberturas, recheios, formatos e texturas (BRASIL, 2005).

Nos últimos anos, os biscoitos se destacaram como produtos de grande interesse comercial, em decorrência de sua variedade de formas e sabores, longa vida de prateleira, praticidade na produção e comercialização, assim como no consumo (MANLEY, 1996; LOPES et al., 2012). Esses produtos são consumidos por pessoas de qualquer idade e possuem grande poder atrativo, principalmente para público infantil (LOPES et al., 2012).

Dados da Pesquisa Nacional de Saúde Escolar, realizada na rede de ensino pública e privada, no ano de 2009, com alunos do ensino fundamental das vinte e seis capitais e Distrito Federal (n=60.973), demonstraram um consumo significativo de biscoito doce na referida faixa etária, de seis a 14 anos, equivalente a 33,6 % dos estudantes (LEVY et al., 2010). CONCEIÇÃO et al. (2010) também investigaram o consumo alimentar de escolares entre nove e 16 anos (n=570), em São Luís do Maranhão, e observaram consumo de biscoitos por 52,6 % dos indivíduos, sendo que tais produtos se encontraram entre os alimentos mais consumidos.

No Brasil, a comercialização de biscoitos segue tendência de aumento, nos últimos anos. Em 2014, o aumento das vendas representou aproximadamente 10,5 % em relação ao ano anterior, totalizando R\$ 19,67 bilhões (ABIMAPI, 2015). O crescimento do comércio de biscoitos semidoces, como os tipos Maria e Maisena, acompanharam esse crescimento, com vendas de 193 mil toneladas (ABIMAPI, 2015).

O varejo brasileiro de biscoitos é o segundo maior do mundo, com vendas no ano de 2014 na ordem de US\$ 9,19 bilhões, ficando atrás somente dos EUA, que movimentaram US\$ 14,1 bilhões (ABIMAPI, 2015) no mesmo período. O consumo per capita de biscoitos no Brasil atingiu 8,4 kg/ano em 2014, o que representou um crescimento de 17 % em relação ao ano de 2010 quando o volume atingiu 7,18 kg/ano (ABIMAPI, 2015).

De acordo com informações do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), exportações de biscoitos trouxeram US\$ 96 milhões para os fabricantes que operaram no país em 2014. Esse valor correspondeu a 45,5 mil toneladas de biscoitos despachadas para os mais diversificados destinos. O principal comprador dos biscoitos brasileiros é Angola, com participação de 34,3 %; o segundo são os EUA, com 16,5 %; seguidos por Paraguai (14,9 %), Uruguai (11,8 %) e Chile (3,9 %) (ABIMAPI, 2015).

O Brasil também é importador de biscoitos, em 2014, desembarcaram no Brasil 7,03 mil toneladas de biscoitos a um custo de US\$ 35 milhões. A principal origem dos produtos são os EUA, representando 27,3 % do total; Alemanha, com 13,4 %; seguida pela Polônia (11,4 %), Itália (10,4 %) e Argentina (10,3 %) (ABIMAPI, 2015).

Os biscoitos podem ser classificados de acordo com sua textura e dureza (biscoitos, *crackers* e *cookies*); com os métodos de formação e corte da massa (fermentados, desenvolvidos, laminados, moldados, depositados, cortados a fio, extrusados e coextrusados); e com enriquecimentos. Ademais, existem outras classificações relacionadas ao processamento secundário que o biscoito assado é submetido (MANLEY, 2001).

Os biscoitos semidoces são formulações atraentes devido seu baixo custo de produção. Sua massa é caracterizada por uma rede de glúten bem desenvolvida. Esses produtos possuem superfície lisa com brilho e textura que vai de dura a delicada (MANLEY, 2001).

Os ingredientes que se encontram em maior proporção nos biscoitos são farinha, açúcar e gordura. Outros ingredientes como leite, manteiga, queijos e ovos também podem ser usados na produção de biscoitos, com o objetivo de melhorar o valor nutricional do produto e o sabor. Também são empregados sal, fermentos químicos, emulsificantes, agentes de redução e água (MANLEY, 1996).

A farinha de trigo é o principal ingrediente de quase todas as formulações de biscoitos. Possui função estrutural e é composta, principalmente, por amido, fibras e proteínas. O conteúdo de proteína da farinha se relaciona com a formação do glúten. O glúten é responsável pela



característica de força e elasticidade da farinha, determinando assim a quantidade de farinha a ser utilizada para cada tipo de produto (CAUVAIN & YOUNG, 2006). Segundo CAUVAIN & YOUNG (2006), o conteúdo de proteína dos biscoitos devem ser de 9 % a 11 %. Outros autores como DAVIDSON (2015), contudo, sugerem que a farinha não exceda 9 % de proteína, pois níveis superiores a esse pode resultar em biscoito duro.

Os açúcares são responsáveis por características sensoriais e estruturais dos biscoitos. Sensorialmente, conferem cor e sabor, enquanto estruturalmente, afetam a gelatinização do amido e a expansão do biscoito. O tipo de açúcar mais usado em receitas de biscoitos é o açúcar refinado (CAUVAIN & YOUNG, 2006).

As gorduras contribuem para aeração dos biscoitos, são amaciantes que agem diretamente na textura, além de contribuírem para o sabor. Esses ingredientes podem ser de origem animal (manteiga e/ou banha) e vegetal, sendo mais usual a utilização de gordura vegetal submetida a processos de hidrogenação (CAUVAIN & YOUNG, 2006).

O leite fluido é uma mistura de água, gorduras e proteínas, que contribui para a hidratação da massa e confere cor e sabor. No entanto, esse tipo de leite é menos utilizado na fabricação de biscoitos, devido ao seu curto prazo de validade e dificuldades no manuseio, sendo mais comum a utilização de produtos secos, como o leite em pó (MANLEY, 1996).

O cloreto de sódio é utilizado como um intensificador de sabor e também para controlar a taxa e a extensão da fermentação (DAVIDSON, 2015). Ademais, o referido ingrediente é importante por controlar a atividade de água e aumentar a vida de prateleira dos biscoitos (CAUVAIN & YOUNG, 2006).

Os fermentos químicos utilizados em quase todos os biscoitos doces são bicarbonato de amônio e bicarbonato de sódio. O bicarbonato de sódio é o agente de aeramento mais importante (DAVIDSON, 2015). Quando aquecido libera metade de dióxido de carbono, deixando carbonato de sódio como o sal residual, na presença de um ácido todo dióxido de carbono é liberado e não haverá nenhuma ação de amaciamento do glúten ou escurecimento da cor do biscoito (CHAMOUN, 2015). Já o bicarbonato de amônio se decompõe durante

o forneamento, produzindo dióxido de carbono, amônia e vapor de água (CHAMOON, 2015; DAVIDSON, 2015).

Segundo CHAMOON (2015), os emulsificantes, como a lecitina de soja, estabilizam as emulsões de óleo em água e de água em óleo, modificando a cristalização da gordura, alterando a consistência da massa e lubrificando as massas pobres em gordura. Ademais, melhoram a eficiência da gordura e as propriedades de encurtamento da massa (CHAMOON, 2015).

O metabisulfito de sódio é um agente de redução para a modificação da resistência do glúten em massas, modifica a proteína para formar uma massa macia extensível (DAVIDSON, 2015).

A função da água está associada com a solubilização e dispersão dos ingredientes durante a mistura da massa e a formação do glúten por meio da hidratação das proteínas, sendo que a massa não desenvolve adequadamente sua elasticidade na insuficiência desse ingrediente (CAUVAIN & YOUNG, 2006; AQUINO, 2012). Ademais, a água promove formação de meio úmido favorável às atividades fermentativas e enzimáticas (AQUINO, 2012).

O biscoito do tipo Maria é um biscoito semidoce, de massa dura, caracterizado por cor uniforme, atraente textura e bom volume (DAVIDSON, 2015). É classificado na Europa e Ásia como um biscoito leve, crocante, com textura delicada, coloração pálida e superfície clara (DAVIDSON, 2015). Sua massa pode ter algumas características específicas como, massa com glúten forte, desenvolvida, que fornece massa elástica que pode ser laminada e cortada; massa com baixo teor de açúcar e gordura; teor de água de aproximadamente 12 % (DAVIDSON, 2015).

Na **Tabela 2** encontram-se compiladas formulações descritas para biscoitos tipo Maria na literatura. Em levantamento realizado com rótulos de biscoitos deste tipo, de três diferentes marcas de abrangência nacional, foram identificados como ingredientes: farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico, açúcar, gordura vegetal, açúcar invertido, cloreto de sódio, bicarbonatos de amônio e sódio, lecitina de soja, metabissulfito de sódio e aromatizante. Neste sentido, observou-se que as formulações comercializadas no Brasil cumprem com os ingredientes básicos citados na literatura.

**Tabela 2.** Formulações de biscoitos semidoces do tipo Maria descritas na literatura

Ingrediente	Quantidade (g)				
	MANLEY (1996)	Formulação I MANLEY (2001)	Formulação II MANLEY (2001)	CAUVAIN & YOUNG (2006)	DAVIDSON (2015)
Farinha de trigo	100	100	98,98	100	100
Farinha de milho	-	-	1,02	-	4,41
Farinha de amido	-	-	-	-	14,7
Açúcar refinado	20,8	21,4	28,79	19 a 25	25,59
Xarope de glicose a 80%	-	-	1,44	-	7,94
Xarope de cana a 80 %	-	2,68	-	-	-
Extrato de malte a 80 %	-	2,14	-	-	-
Margarina	16,1	-	21,6	13 a 20	-
Gordura vegetal ( <i>shortening</i> )	-	21,4	-	-	11,03
<b>Leite em pó desnatado</b>	<b>2,5</b>	-	<b>9,0</b>	<b>1,4 a 1,7</b>	-
Cloreto de sódio	0,8	1,25	0,99	1,0	0,88
Bicarbonato de amônio	0,63	0,85	0,42	0,4 a 1,5	0,73
Bicarbonato de sódio	0,4	0,45	0,48	0,4 a 0,6	0,67
Lecitina de soja	0,3	-	-	0,26 a 0,4	0,57
Metabissulfito de sódio	0,022	0,039	-	0,030 a 0,035	0,02
Protease	-	-	-	-	0,02
Fosfato ácido de cálcio	-	-	-	-	0,08
Água	17,8	20	20	19 a 24	26,47

O preparo dos biscoitos envolve várias etapas, como mistura da massa, laminação e moldagem, assamento, resfriamento e embalagem. Cada qual possui suas peculiaridades que são cruciais para produção de biscoitos com parâmetros de identidade e qualidade específicos (CAUVAIN & YOUNG, 2006; CHAMOOUN, 2015).

A mistura dos ingredientes é um ponto crítico para o desenvolvimento de uma massa macia e extensível. É importante por promover a solubilização, hidratação e dispersão de vários ingredientes (CAUVAIN & YOUNG, 2006). O tempo adequado para mistura deve ser suficiente para a dissolução dos açúcares, hidratação da farinha e desenvolvimento extensível do glúten (MANLEY, 2001). Segundo CAUVAIN & YOUNG (2006), batedeiras que atingem 50 rpm requerem um tempo de mistura de 20 a 25 minutos e batedeiras de 90 rpm pode misturar a massa de forma satisfatória em 2 a 3 minutos. O fim da mistura de algumas massas é definido pelo momento em que a massa atinge 40 °C a 42 °C na presença de metabissulfito de sódio, e de 44 °C a 46 °C na ausência desse aditivo (CAUVAIN & YOUNG, 2006). Já MANLEY (2001) relata que misturar a massa até que a mesma atinja temperaturas entre 35 °C e 40 °C é um bom parâmetro para controlar o tempo de mistura. DAVIDSON (2015) refere que a massa de biscoito Maria deve ser misturada até que a temperatura alcance 40 °C a 42 °C.

A laminação é uma etapa importante para os biscoitos laminados, como o biscoito tipo Maria. Esse procedimento elimina gases indesejados, produz biscoitos com estruturas finas e determina a qualidade do produto final (CAUVAIN & YOUNG, 2006).

O assamento consiste em assar a massa já misturada, laminada e cortada, a fim de remover a umidade, dar cor e propiciar uma série de reações químicas e físicas no produto final. Nesta etapa, ocorrem as alterações que transformam a massa crua em biscoito (MANLEY, 2001).

Três importantes alterações físico-químicas afetam os componentes da massa durante o cozimento. Em primeiro lugar, ocorre uma diminuição na solubilidade da proteína, o que corresponde a uma maior agregação térmica, que começa a uma temperatura acima de 85 °C. Em seguida, ocorre a

desestruturação do amido durante o primeiro terço do período de cozimento limitado pela secagem do biscoito. Para finalizar, ocorre uma diminuição na redução do teor de açúcar nos últimos dois terços do período de cozimento, correlacionando com a cor da superfície (CHEVALLIER et al., 2002). Alguns autores sugerem diferentes temperaturas e tempo de assamento de biscoitos semi doces como representado na **Tabela 3**.

O biscoito tipo Maria é tradicionalmente assado em bandeja de aço. Forno híbrido é ideal com zonas de gás direta, seguida de zonas radiantes ou convecção indiretos (DAVIDSON, 2015). As condições de assamento ocorrem por 5 a 6,5 minutos em temperatura de 180 °C (MANLEY, 1996).

**Tabela 3.** Condições de tempo e temperatura para assamento de biscoitos semidoces

<b>Tipo de biscoito</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Referência</b>
Biscoito semidoce	180 a 220	10 a 30	PATENTE PI 9905597-0 A (03/07/01)
Biscoito amanteigado	160	6	LOPES et al. (2012)
Biscoito tipo <i>cookie</i>	185	15 a 25	OKPALA & OKOLI (2012)
Biscoito semidoce com adição de achocolatado	200	23	SANTOS et al.(2010)
Biscoito tipo <i>Cookie</i>	200	15	MORAES et al. (2010)
Biscoito semidoce	180, 200 e 220	5 a 6,5	MANLEY (2001)
Biscoito semidoce do tipo Maria	180, 200 e 220	5 a 6,5	DAVIDSON (2015)

O resfriamento constitui uma etapa importante no processamento de biscoitos, que contribui para evitar a quebra dos biscoitos após embalados devido a um gradiente de umidade interna (DAVIDSON, 2015).

Os biscoitos são alimentos que podem estar contaminados com proteínas alergênicas como a  $\beta$ LG. Os focos de contaminação desse produto, são decorrentes de matérias primas contaminadas com alérgenos não declarados, resíduos de alérgenos em equipamentos e utensílios compartilhados, além de contaminação cruzada durante diferentes etapas de

processamento, assim como na distribuição, incluindo o recebimento, transporte e armazenamento dos biscoitos.

Os dados de consumo de biscoitos, com destaque para crianças, grupo mais susceptível à APLV; o fato do processamento destes produtos envolver temperaturas elevadas, que geram desnaturação proteica; e a grande diversidade de formulações, que torna estes alimentos passíveis de contaminação por alérgenos em diversos pontos de sua cadeia produtiva, justificaram a escolha desta matriz como objeto de estudo do presente trabalho.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo de degradação de  $\beta$ LG, a validação do método imunoenzimático para detecção de  $\beta$ LG e a avaliação da rotulagem de biscoitos semidoces descritos no presente trabalho foram realizados no Laboratório de Bromatologia - Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos (BRO-UPAA) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da UFMG e no Laboratório de Química Bromatológica da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

### 4.1 EQUIPAMENTOS

- a) Agitador de tubos tipo Vortex (Ika Minishaker MS2 e Phoenix AP56).
- b) Balança analítica com resolução 0,0001 g e capacidade máxima de 220,0000 g, calibrada por laboratório acreditado pela Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0045 (Shimadzu AUX 220).
- c) Balança analítica com resolução 0,001 g e capacidade máxima de 310,000 g, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE do INMETRO de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0045 (Gehaka BK 300).
- d) Banho termostático, com temperatura monitorada por termômetro tipo espeto externo calibrado (Nova Ética 314-8DN).
- e) Batedeira planetária (Arno).
- f) Centrífuga (Jouan, modelo BR4i).
- g) Congelador ajustado em temperaturas entre -18 °C e -24 °C, com temperatura monitorada por termômetro tipo sonda externo calibrado (Electrolux, modelo FE 22).
- h) Cronômetro.
- i) Forno convencional, com temperatura monitorada por termômetro tipo laser externo calibrado (Layr).
- j) Lavadora automática de placas de ELISA automática (BioTek, modelo Elx50)

- k) Leitora de microplacas de ELISA a 450 nm (BioTek, modelo Elx800).
- l) Macropipeta de 1.000 µL a 10.000 µL, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE/INMETRO de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0422 (HTL Lab Solutions LM10000).
- m) Micropipeta de 100 µL a 1.000 µL, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE/INMETRO de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0383 (Thermo Scientific Finnpiquette F3).
- n) Micropipeta de 20 µL a 200 µL, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE/INMETRO de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0486 (Thermo electron corporation Finnpiquette).
- o) Micropipeta multicanal de 30 µL a 300 µL, calibrada por laboratório acreditado pela CGRE/INMETRO de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número LV34537-15 (Eppendorf, modelo Research).
- p) Peneira calibrada de 25 mesh.
- q) Processador de amostras (Cutter Sire).
- r) Refrigerador ajustado em temperaturas entre 2 °C e 8 °C, com temperatura monitorada por termômetro tipo sonda externo calibrado (Eletrolux DFF37 Premium).
- s) Seladora à vácuo (Ez Home 201).
- t) Sistema de purificação de água (Millipore Direct Q 3UV).
- u) Termômetros tipo laser, tipo sonda e tipo espeto, com memória de máxima e mínima, calibrados por laboratório acreditado pela CGCRE/INMETRO de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0338 (Incotherm).

#### 4.2 MATERIAIS

- a) Abridor mecânico de massas.
- b) Assadeira de inox.
- c) Batedor manual de inox.
- d) Béquer de vidro/plástico (50, 100, 250, 600 e 1.000 mL).
- e) *Bowl* de inox.
- f) Espátula raspadora de inox.
- g) Espátula de inox para pesagem.



- h) Etiqueta para identificação dos ingredientes e amostras.
- i) Funil de vidro.
- j) Luva térmica.
- k) Molde e cortador de inox de 4,0 cm de diâmetro.
- l) Pipeta de Pasteur.
- m) Ponteira descartável (20 µL a 200 µL, 200 µL a 1000 µL, e 1 mL a 10 mL).
- n) Proveta (50, 100 e 500 mL).
- o) Rolo de massa de inox.
- p) Sachê tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade.
- q) Tubo tipo Falcon de 50 mL.
- r) Tubo tipo Eppendorf.

### 4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

#### 4.3.1 Reagentes

- a) Ácido clorídrico para análise (p.a.) (Neon) para preparo de solução a 1 mol/L, utilizada para ajuste do pH no preparo da solução tampão de extração do alérgeno contendo aditivo (A-AEP), conforme manual de procedimento do kit ELISA RIDASCREEN FAST β-Lactoglobulin<sup>®</sup>.
- b) Álcool etílico a 70 % (Merck).
- c) Detergente neutro tipo Extran (Merck).
- d) Hidróxido de sódio em micropérolas p.a. (Synth) para preparo de solução a 1 mol/L, utilizada no preparo da solução A-AEP, conforme manual de procedimento do kit ELISA RIDASCREEN FAST β-Lactoglobulin<sup>®</sup>.
- e) Kit de ELISA RIDASCREEN FAST β-Lactoglobulin<sup>®</sup> (R4902) tipo sanduíche, policlonal, com anticorpos específicos para leite de vaca, cabra, ovelha e búfalo, contendo microplaca com 48 poços, padrões de βLG (0; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5 mg/kg), solução de extração, tampão de extração, aditivo, tampão de lavagem, conjugado, cromógeno, solução de parada, certificado e manual do fabricante.
- f) Padrão de βLG 90% de pureza (Sigma-Aldrich).

### 4.3.2 Soluções

#### a) Preparo da solução tampão de extração do alérgeno

O tampão de extração do alérgeno fornecido com o kit foi retirado da refrigeração e levado para o banho termostático na temperatura de 37 °C para que os cristais de tampão fossem dissolvidos. Em seguida, foi agitado manualmente, de forma vigorosa, até não apresentar precipitações do conteúdo. O concentrado aquecido foi diluído na concentração de 1:10 (1+9) com água ultra pura.

#### b) Preparo da solução tampão de extração contendo o aditivo 1 (A-AEP)

Para o preparo da solução de aditivo 1, 1,8 g de aditivo 1 foram pesados em um béquer de 50 mL. adicionados de 20 mL de solução de hidróxido de sódio a 1 mol/L e homogeneizados até total dissolução. Posteriormente, 20 mL da solução de aditivo 1 foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado com solução do tampão de extração do alérgeno. O ajuste do para pH 9, foi realizado com solução de ácido clorídrico a 1 mol/L.

#### c) Preparo da solução de extração 2

A solução de extração 2 foi preparada por diluição do seu concentrado na proporção de 1:2 (1+1) com água ultra pura.

#### d) Preparo da solução de conjugado de anticorpo enzimático

O concentrado do conjugado de anticorpo enzimático foi retirada de refrigeração e agitada, cuidadosamente. 700 uL do concentrado do conjugado de anticorpo enzimático foi diluído em 7 mL de água ultra pura. Essa solução foi preparada em quantidade suficiente para os testes, pois possui estabilidade limitada.

e) Preparo do tampão de lavagem

O tampão de lavagem fornecido com o kit foi retirado da refrigeração e levado para o banho termostático na temperatura de 37 °C para que os cristais de tampão fossem dissolvidos. Em seguida, foi agitado manualmente, de forma vigorosa, até não apresentar precipitações do conteúdo. O concentrado aquecido foi diluído na concentração de 1:10 (1+9) com água ultra pura.

f) Solução de hidróxido de sódio a 1 mol/L

40 g de hidróxido de sódio foram pesados em um béquer de plástico de 100 mL. 250 mL de água ultra pura foram medidos em proveta 250 mL. Em seguida, a água ultra pura foi adicionada em béquer de plástico de 1000 mL e colocada em banho de gelo. O hidróxido de sódio foi adicionado na água aos poucos, mexendo bem com o auxílio de um bastão de plástico. Em seguida, a solução foi transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico de 1000 mL, com auxílio de um funil de plástico. O volume do balão foi completado com água ultra pura. A solução foi homogeneizada e transferida para um frasco de plástico, com auxílio de um funil de plástico.

g) Solução de ácido clorídrico a 1 mol/L (PM = 36,46 g/mol; 37,23 %; D=1,19g/cm<sup>3</sup>).

250 mL de água ultra pura foram medidos em uma proveta de 500 mL e transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL. 84 mL de ácido clorídrico medidos em proveta de 100 mL foram transferidos para o balão contendo a água, cuidadosamente, com auxílio do funil. Ocasionalmente, durante a adição do ácido, o balão foi homogeneizado. O volume do balão foi completado com água ultra pura. A solução foi transferida para um frasco de vidro âmbar, com auxílio do funil.

#### 4.4 INSUMOS

- a) Açúcar refinado 0,5 kg (Guarani).
- b) Bicarbonato de amônio 250 g (Bombay).
- c) Bicarbonato de sódio 250 g (Bombay).
- d) Cloreto de sódio 1 kg (Cisne).
- e) Farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico 5 kg (Rosa Branca).
- f) Lecitina de soja líquida 1 L (Caramuru alimentos).
- g) Leite pasteurizado integral 1 L (Itambé).
- h) Margarina 500 g (Becel).
- i) Metabissulfito de sódio 250 g (Pryme foods).

#### 4.5 AMOSTRAS DE BISCOITO

##### 4.5.1 Formulações para estudo de degradação e validação do kit

Duas formulações de biscoitos semidoces tipo Maria foram desenvolvidas, empregando os ingredientes básicos, sendo o percentual dos diferentes ingredientes estimado como a média das formulações descritas na literatura (MANLEY, 1996; MANLEY, 2001; CAUVAIN & YOUNG, 2006; DAVIDSON, 2015), exceto para o leite, o qual não foi empregado como ingrediente, mas sim como contaminante.

O leite utilizado foi o integral fluido pasteurizado em substituição ao leite em pó desnatado das formulações publicadas na literatura. O objetivo desta alteração foi empregar uma matriz de leite submetida a processamento térmico mais brando, de forma que a fração proteica estivesse preservada. Isto porque no processo de atomização para produção de leite em pó, o leite, pulverizado em gotículas, entra em contato com uma corrente de ar filtrado e quente entre 160 °C e 200 °C (MUJUMDAR, 1995); enquanto na pasteurização rápida, o leite é submetido a 75 °C por 15 a 20 segundos (FELLOWS, 2006). Cumpre destacar que no leite fluido (3,5 % de proteínas) as proteínas não estão concentradas como no leite em pó (25,4 % de proteínas) (TACO, 2011), o que

favoreceu a simulação de níveis baixos de contaminação nas formulações experimentais (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Formulações dos biscoitos semidoces tipo Maria para uso experimental

Ingrediente	Quantidade (g)	
	Sem leite	0,25 % de leite fluido
Farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico		100,0
Açúcar refinado		23,7
Margarina		18,9
Cloreto de sódio		1,0
Bicarbonato de amônio		0,7
Bicarbonato de sódio		0,5
Lecitina de soja		0,4
Metabissulfito de sódio		0,02
<b>Leite fluido integral pasteurizado</b>	<b>0</b>	<b>0,4</b>
Água		20,9

Todos os materiais e bancada foram previamente lavados com detergente neutro, secos a temperatura ambiente e desinfetados com álcool etílico a 70 %. Os analistas estavam devidamente paramentados e seguiram princípios de boas práticas de fabricação para evitar a contaminação dos produtos formulados.

Os ingredientes utilizados na produção dos biscoitos, de grau alimentício, foram pesados individualmente e transferidos para um *bowl* de inox, sendo o bicarbonato de amônio dissolvido em um pouco de água antes de ser incorporado à massa (MANLEY, 2001). A mistura ocorreu com auxílio de batedeira durante 5 minutos, seguida de amassamento manual até obtenção

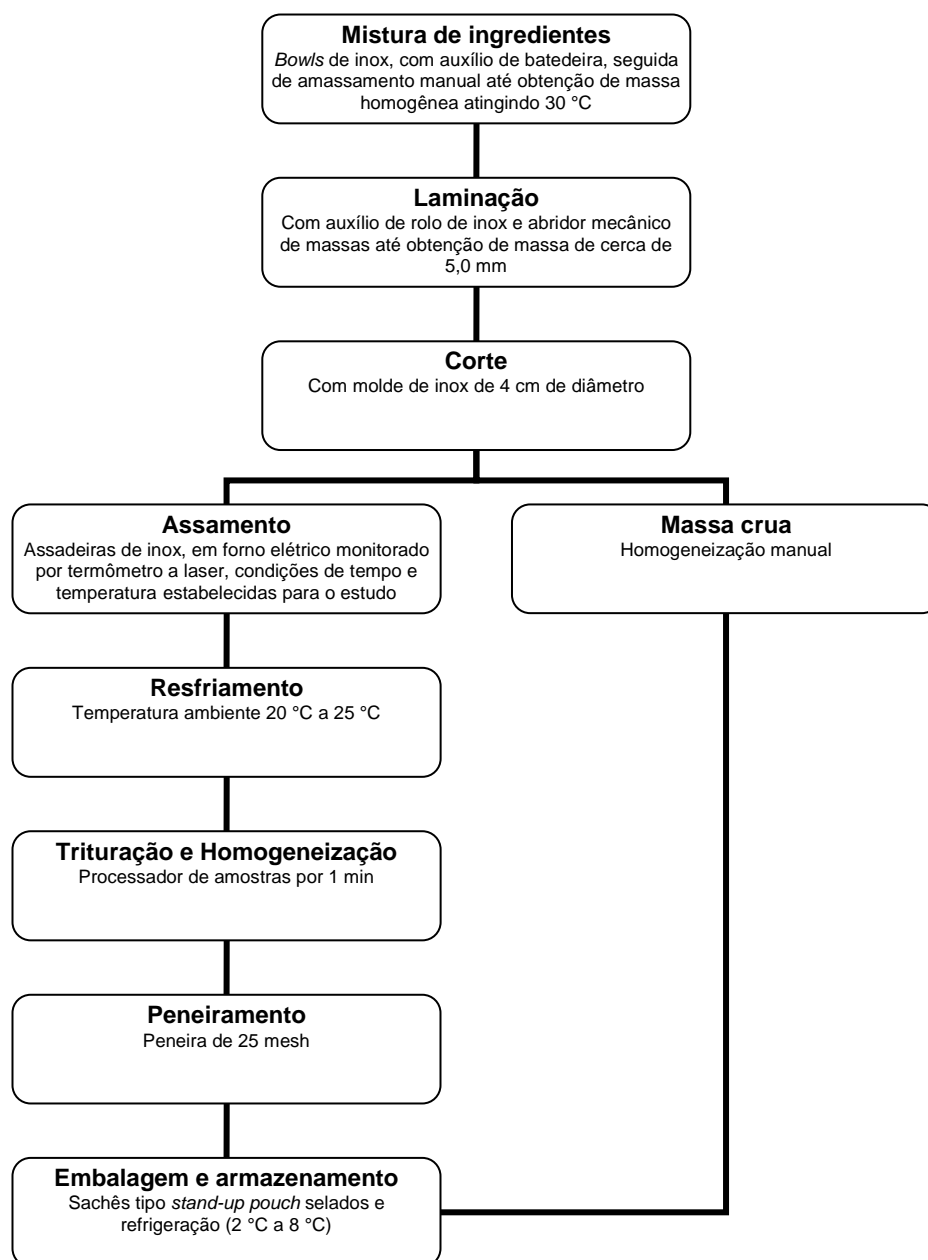
de massa uniforme que atingiu aproximadamente 30 °C. Posteriormente, as massas foram laminadas com auxílio de rolo de inox e abridor mecânico de massas, até atingirem uma espessura de 5 mm, sendo cortadas com moldes de inox, redondos, de 4,0 cm de diâmetro, resultando em biscoitos crus de aproximadamente 15 g.

Uma parte dos biscoitos foi submetida ao assamento nas condições de tempo e temperatura estabelecidas para o estudo em questão. Tais biscoitos foram dispostos em assadeiras de inox e assados em forno elétrico, com temperatura monitorada por termômetro a laser. Os biscoitos assados, com aproximadamente 11,3 g, foram resfriados em temperatura ambiente (20 °C a 25 °C), removidos das assadeiras com auxílio de espátulas raspadoras de inox e triturados/homogeneizados em processador, durante 1 minuto, seguido de peneiramento.

Outra parte dos biscoitos, não foi assada, sendo mantida crua. Tais biscoitos foram homogeneizados manualmente.

As amostras obtidas, assadas e cruas, foram acondicionadas em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade de 100 g, seladas e mantidas sob refrigeração (2 °C a 8 °C) até o momento dos ensaios (**Figura 4**).

**Figura 4.** Fluxograma do processamento dos biscoitos semidoces tipo Maria.



#### 4.5.2 Comerciais

Dezoito amostras comerciais de biscoitos semidoces foram coletadas no comércio de Minas Gerais. Seis diferentes marcas de biscoito tipo Maisena, duas diferentes marcas do tipo Maria e uma marca de biscoito leite foram coletadas no ano de 2014 e 2015. A amostragem foi repetida para os mesmos tipos e marcas de biscoitos no ano de 2016, após a obrigatoriedade da RDC nº26/2015 (BRASIL, 2015a).

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DE $\beta$ LG EM BISCOITO SEMIDOCE POR ELISA

O ensaio fundamenta-se na reação antígeno anticorpo. Os poços de microtitulações do kit de ELISA RIDASCREEN FAST  $\beta$ -Lactoglobulin<sup>®</sup> são revestidos com anticorpos específicos para proteínas da  $\beta$ LG. Ao adicionar a solução padrão da curva fornecida pelo fabricante do kit ou extrato de amostra nos poços, a  $\beta$ LG presente se liga aos anticorpos específicos, resultando em um complexo antígeno anticorpo. Na etapa seguinte é feita uma lavagem para que os componentes não ligados sejam removidos e o anticorpo conjugado com a enzima peroxidase é adicionado. Esse conjugado de anticorpo ligado ao complexo antígeno anticorpo formara um complexo anticorpo antígeno anticorpo (“sanduiche”). Uma solução de cromógeno é, então, adicionada após a remoção do conjugado enzimático em nova etapa de lavagem. O conjugado enzimático ligado converte o cromógeno em um produto de coloração azul. Finalmente, a adição de uma solução de parada leva a uma mudança na coloração de azul para amarela. A medição é feita por espectrofotometria a 450 nm, sendo a intensidade de absorção proporcional à concentração de  $\beta$ LG no padrão ou na amostra.

Na etapa de extração, 1 g de amostra de biscoito semidoce triturado e tamisado foi pesado em tubo do tipo Falcon de 50 mL. 4 mL da solução de extração, medidos em macropipeta, foram adicionados ao tubo, que foi agitado, vigorosamente, em agitador do tipo Vortex por 1 minuto. O tubo foi, então, aquecido em banho termostático a 100 °C por 10 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 16 mL de solução de A-AEP (previamente aquecida a 60 °C) ao tubo, que foi agitado em agitador do tipo Vortex por 1 minuto. O tubo foi aquecido em banho termostático a 60 °C por 10 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo e centrifugação por 10 minutos a uma rotação de 4000 rpm. O extrato foi obtido por diluição, do sobrenadante numa proporção de 1:5 (v/v) com tampão de extração diluído sem aditivo, em tubo tipo Eppendorf, empregando micropipeta.



Para o ensaio, alíquota de 100 µL dos extratos de amostras e padrões foram transferidos para poços da microplaca, empregando micropipeta. A microplaca foi mantida incubada por 10 minutos em temperatura ambiente (20 °C a 25 °C). Em seguida, o conteúdo líquido da microplaca foi lavado com tampão de lavagem, empregando lavadora automática com programa correspondente à três ciclos de 250 µL. 100 µL do conjugado enzimático foram adicionados aos poços, empregando micropipeta, seguido de homogeneização manual. A placa foi novamente incubada por 10 minutos em temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) e o conteúdo líquido da microplaca foi lavado com tampão de lavagem, com três ciclos de 250 µL na lavadora automática. 100 µL da solução de cromógeno foram adicionados em cada poço, utilizando micropipeta, seguido de homogeneização manual. A microplaca foi mantida incubada por 10 minutos em temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) no escuro. Para finalizar o ensaio, a cada poço foram adicionados 100 µL de solução de parada. A placa foi homogeneizada, manualmente, e a absorbância foi medida em leitora de microplaca, no intervalo de 10 minutos, a 450 nm. As absorbâncias lidas para as amostras e padrões foram digitadas em planilha do programa RIDA®SOFT Win e resultados eram automaticamente gerados de acordo com os modelos propostos pelo fabricante.

#### 4.7 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE βLG NO PROCESSAMENTO DE BISCOITOS SEMIDOCES

##### 4.7.1 Delineamento experimental

Para determinação da concentração de leite fluido integral a ser empregada na formulação dos biscoitos para os estudos de degradação foram considerados:

- i) a proporção de 0,35 % de βLG no ingrediente leite fluido integral (3,5 % de proteínas, das quais 20 % proteínas do soro, das quais 50 % βLG);
- ii) a faixa de quantificação de βLG, entre 0,5 mg/kg e 13,5 mg/kg, declarada pelo fabricante do kit de ELISA RIDASCREEN FAST β-Lactoglobulin®;

- iii) o rendimento na produção de biscoitos, considerando as massas médias de massa crua e de biscoitos assado (75 %); e
- iv) os dados de estudos prévios de degradação da  $\beta$ LG durante o assamento de biscoitos (MONACI et al., 2011; KHUDA et al., 2012).

Então, foram formulados biscoitos semidoces com 0 % e 0,25 % de leite fluido integral pasteurizado, sendo cada formulação produzida em duas bateladas distintas. Em cada batelada, a formulação contendo 0,25 % de leite foi dividida em 18 porções, que foram submetidas ao assamento, sob diferentes condições, segundo experimento fatorial completo que foi delineado envolvendo o fator temperatura em três níveis (150, 180 e 210 °C) e o fator tempo em seis níveis (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos). Tais condições incluíram as faixas descritas na literatura, compiladas na **Tabela 3**. A formulação 0 % de leite foi dividida em duas porções, sendo uma mantida crua e outra parte assada na condição mais branda do estudo. Essas amostras, além das matérias-primas isoladas (farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico, açúcar refinado, margarina e lecitina de soja), corresponderam aos controles negativos do experimento.

Para cada batelada, foram produzidos 300 g da formulação 0 % de leite e 2.700 g da formulação 0,25 % de leite, que renderam, respectivamente, 20 e 180 biscoitos. Destes, foram tomados, aleatoriamente, 10 biscoitos que foram distribuídos entre os diferentes tratamentos.

A análise de  $\beta$ LG foi feita empregando o kit de ELISA RIDASCREEN FAST  $\beta$ -Lactoglobulin<sup>®</sup>, em duplicata, para cada tratamento de cada batelada.

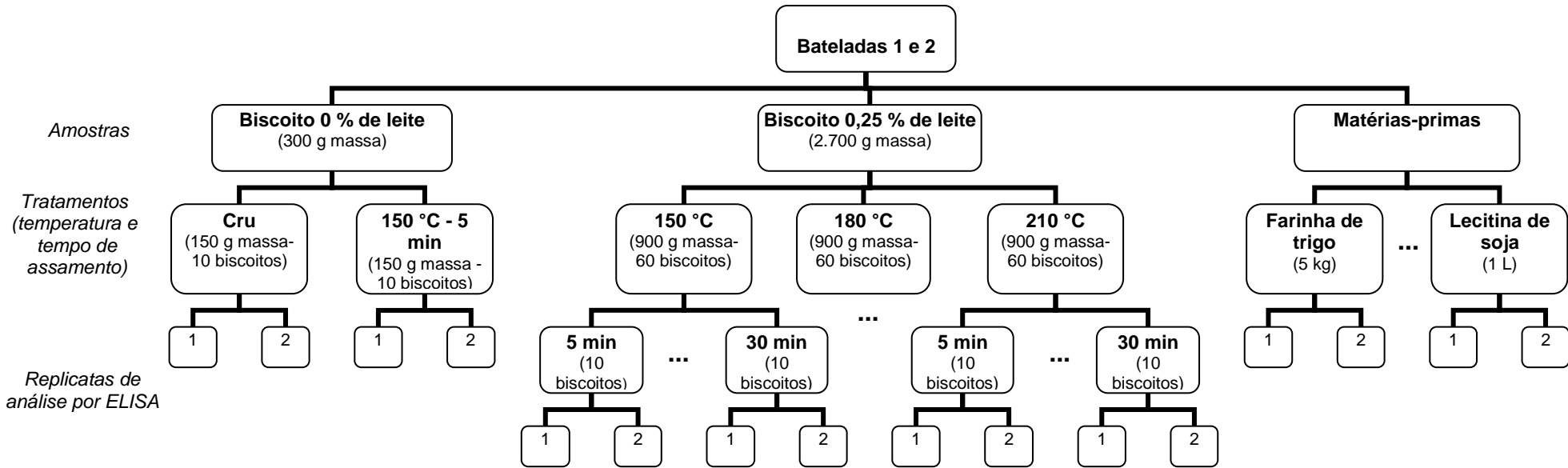
Uma esquematização do delineamento experimental do estudo de degradação encontra-se representada na **Figura 5**.

#### 4.7.2 Análise estatística

Os resultados obtidos do experimento fatorial 6 x 3 foram avaliados quanto a sua distribuição, pelo teste de Ryan-Joiner. Em seguida, tais dados foram submetidos à análise de variância e as médias estimadas para os diferentes tratamentos foram discriminadas pelo teste de Tukey (PIMENTEL-GOMES, 2009). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi

$\alpha = 0,05$ . Os programas utilizados para a análise estatística foram Microsoft Excel 2010<sup>®</sup> e Minitab<sup>®</sup>.

**Figura 5.** Delineamento experimental para o estudo de degradação da  $\beta$ -lactoglobulina no assamento de biscoitos semidoces tipo Maria



## 4.8 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE KIT DE ELISA PARA DETERMINAÇÃO DE $\beta$ LG EM BISCOITOS SEMIDOCES

### 4.8.1 Delineamento experimental

Para o estudo de validação foram elaborados biscoitos semidoces com 0 % de leite assados na temperatura de 180 °C por 25 minutos em três bateladas distintas de 400 g de massa, resultando cerca de 27 biscoitos. De cada uma das duas primeiras bateladas foram tomadas 90 alíquotas de 1 g de biscoito, que foram adicionadas de solução padrão de  $\beta$ LG, em pelo menos oito níveis de concentração, na faixa de determinação do kit, mais o branco, sendo cada nível preparado em dez replicatas independentes (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Níveis de concentração de  $\beta$ -lactoglobulina adicionados nas amostras de biscoito para estudo de validação

Concentração final de BLG (mg/kg)	Volume de solução de trabalho de $\beta$ LG ( $\mu$ L)	Volume de solução de extração do kit ( $\mu$ L)
0	0	4000
0,25	10	3990
0,5	20	3980
1,0	40	3960
1,5	60	3940
3,0	120	3880
4,5	180	3820
9,0	360	3640
13,5	540	3460

Concentração da solução de trabalho: 25  $\mu$ g/mL;  $\beta$ LG:  $\beta$ -lactoglobulina.

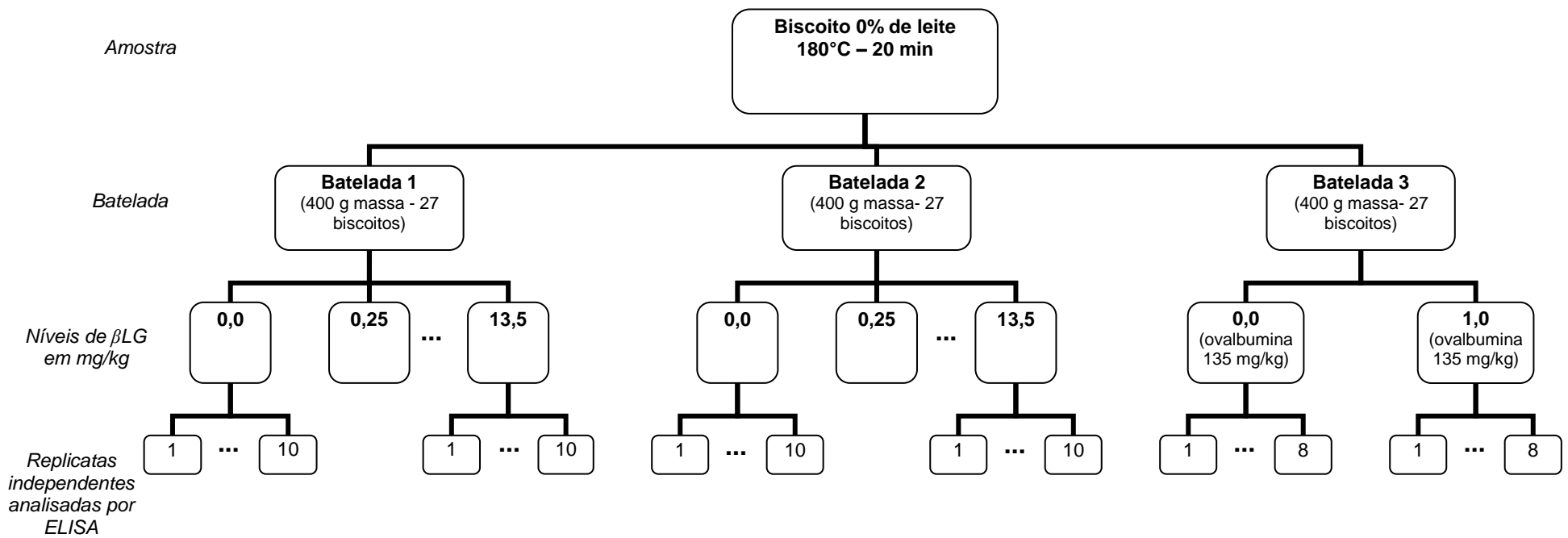
A terceira batelada de biscoito foi utilizada para o estudo de seletividade complementar, da qual foram tomadas 16 alíquotas de 1 g de biscoito. Em oito replicatas foram adicionadas soluções padrão de  $\beta$ LG e o do interferente em potencial, a ovalbumina; enquanto nas oito demais foi adicionada somente a solução de ovalbumina. O nível de concentração de  $\beta$ LG correspondeu ao menor

nível que apresentou 100 % de TSB na etapa anterior da validação (1 mg/kg), já o nível do interferente foi estabelecido como 135 mg/kg, dez vezes maior que o último ponto da curva do kit.

As replicatas de cada batelada foram analisadas em condições de precisão intermediária, ou seja, no mesmo laboratório, em diferentes dias e por diferentes analistas (EC, 2002; THOMPSON et al., 2002; SOUZA et al., 2007).

Uma representação esquemática do delineamento experimental do estudo de validação está apresentada na **Figura 6**.

**Figura 6.** Delineamento experimental para o estudo de validação do kit de ELISA para detecção de  $\beta$ -lactoglobulina em biscoitos semidoces



#### 4.8.2 Análise estatística – abordagem quantitativa

Após estimativa das concentrações de  $\beta$ LG nas replicatas das amostras adicionadas de padrão, as recuperações foram calculadas para cada nível de concentração estudado. Após tratamento de *outliers* pelo teste de Grubbs, as recuperações médias foram estimadas (SOUZA et al., 2007) e os resultados foram considerados satisfatórios quando se apresentaram entre 80 % e 110 % (EC, 2002).

Os desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade (DPRr) e de precisão intermediária (DPRR), foram estimados para cada nível, por análise de variância ANOVA, com verificação prévia das premissas de normalidade (Teste de Ryan-Joiner) e homoscedasticidade (Teste de Brown-Forsythe) (SOUZA et al., 2007). Os DPRr foram considerados aceitáveis quando menores ou iguais a um terço dos desvios estimados pelos modelos de Horwitz, enquanto os DPRR foram aceitáveis quando menores ou igual aos desvios estimados pelos referidos modelos (EC, 2002).

Para o estudo da seletividade foram avaliados os resultados obtidos para amostras brancas. O LD teórico foi calculado a partir da média das leituras de amostras brancas mais três vezes o DP, já o LQ foi estimado como sendo igual à média das leituras de amostras brancas somada de dez vezes o DP (EC, 2002; SOUZA et al., 2007).

#### 4.8.3 Análise estatística – abordagem qualitativa

Para abordagem qualitativa foram consideradas positivas as amostras cujas concentrações finais foram quantificadas pelo kit e negativas aquelas reportadas como < 0,5 mg/kg.

Para cada nível de concentração, as taxas de falsos resultados, bem como TST, TSB e TCF, foram calculadas por meio de tabelas de contingência (GONDIM et al, 2014).

A ACO e CON foram estimadas por análise combinatória, para cada nível de concentração estudado, sendo que o método foi considerado



suficientemente padronizado e preciso quando obtidos resultados de ACO iguais a 1 fora da RPC (GONDIM et al., 2014).

Curvas de desempenho (porcentagem de resultados positivos *versus* concentração de  $\beta$ LG em mg/kg) foram plotadas para estudo da RPC, empregando modelo não linear proibido, sendo considerados o perfil não tendencioso do gráfico de resíduos e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) como critérios para avaliação do modelo. A RPC foi representada pela região entre 5 % e 95 % de resultados positivos (ou seja, entre 95 % e 5 % de falsos-negativos), sendo o LD o limite superior da RPC. O LD foi considerado aceitável quando cobriu as concentrações de interesse ou regulamentadas (GONDIM et al., 2014).

A seletividade complementar foi estudada na presença de ovalbumina, sendo avaliada pela alteração na TCF no nível zero e no menor nível de concentração de  $\beta$ LG para o qual tenha sido obtida TCF de 100 %. O método foi considerado seletivo quando o interferente em questão não impactou a TCF (GONDIM et al., 2014).

## 4.9 AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM DE AMOSTRAS COMERCIAIS

### 4.9.1 Delineamento experimental

Para avaliação da adequação da rotulagem de biscoitos semidoces das diferentes marcas foram verificados os requisitos regulamentados estabelecidos nas legislações vigentes, conforme proposto por SANTOS (2014). Os rótulos foram analisados por três analistas, sendo os casos de divergência definidos por desempate (**Figura 7**).

A seguir encontram-se relacionadas as legislações e respectivos requisitos avaliados.

Portaria INMETRO nº 157 de 19 de agosto de 2002 – Aprova o Regulamento Técnico Metrológico sobre a forma de expressão o conteúdo líquido a ser utilizado nos produtos pré medidos:

- indicação quantitativa do produto expressa no Sistema Internacional de Unidades;
- dimensões mínimas dos caracteres alfanuméricos das indicações quantitativas de conteúdo líquido; e
- expressões que precedem a indicação quantitativa.

RDC nº 259 de 20 de setembro de 2002 - Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados:

- denominação de venda do alimento;
- lista de ingredientes;
- conteúdos líquidos;
- identificação da origem;
- nome ou razão social;
- identificação do lote;
- declaração de aditivo/ número do INS (Sistema Internacional de Numeração);
- indicação terapêutica ou informação que induza o consumidor a erro;
- prazo de validade;
- instruções sobre o preparo e uso do alimento, quando necessário; e
- condições especiais de conservação.

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:

- Inscrição “contém glúten” ou “não contém glúten”.

RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003 - Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional:

- apresentação correta da tabela de informação nutricional;
- informação nutricional por porção e medida caseira;

- informação nutricional no idioma oficial do país de consumo do alimento, em lugar visível, com letras legíveis, que não possam ser apagadas ou rasuradas, e em cor contrastante com fundo onde estiver impressa;
- declaração de valor energético e nutrientes;
- apresentação correta da ordem dos componentes da informação nutricional;
- conversão kcal para kJ;
- porcentagem de valor diário (%VD); e
- as vitaminas e minerais, sempre que estiverem presentes em quantidade igual ou maior a 5 % da Ingestão Diária Recomendada (IDR), por porção indicada no rótulo, podem ser declaradas.

RDC nº 359 de 23 de dezembro de 2003 - Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional:

- informação da medida caseira.

RDC nº 54 de 12 de novembro de 2012 - Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar:

- quantidade do nutriente sobre o qual foi feita uma Informação Nutricional Complementar (INC) declarada na tabela de informação nutricional;
- quando o rótulo apresentar características inerentes ao alimento, deve haver próximo à declaração, de que todos os alimentos daquele tipo possuem essas características;
- no caso de INC comparativa, o produto deve ser comparado ao similar convencional;
- valores estabelecidos para o atributo “não contém”, declarados na tabela de informação nutricional como “zero”, “0” ou “não contém”;
- indicação na tabela de informação nutricional da quantidade de açúcares abaixo dos carboidratos, para uma INC sobre a quantidade de açúcares;
- a INC refere-se ao alimento pronto para o consumo, preparado, quando for o caso, de acordo com as instruções de preparo indicadas pelo fabricante, sempre que estas propriedades não sejam perdidas;

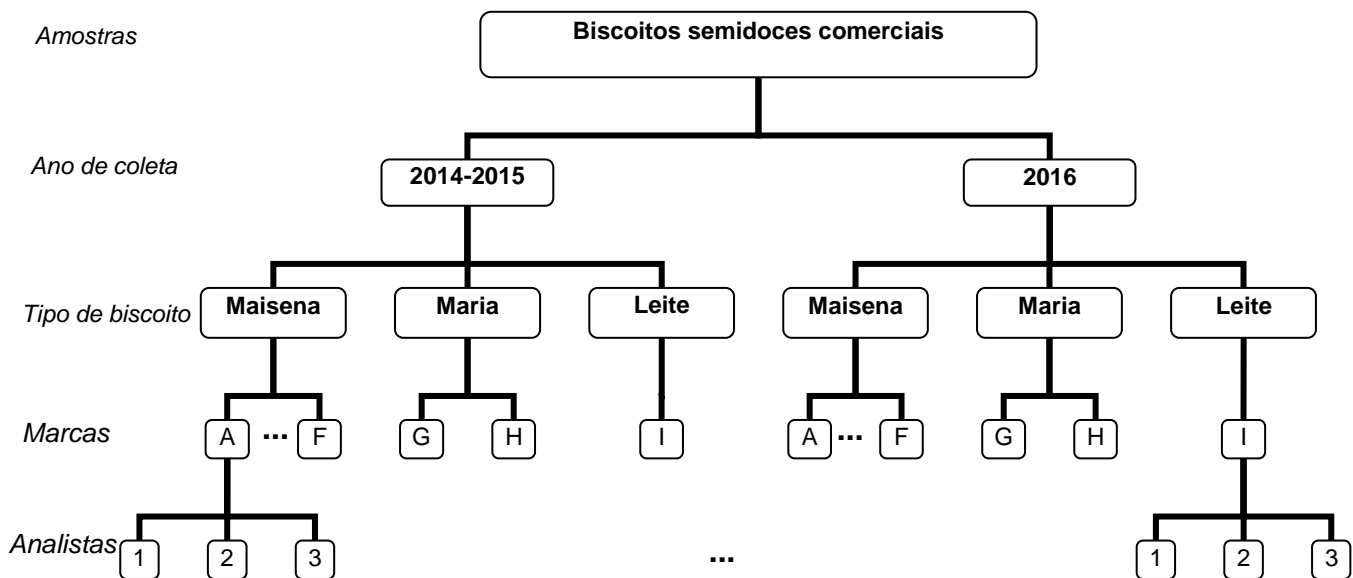
- declarações realizadas para os atributos “fonte” e “alto teor”, não podem considerar no cálculo da INC a contribuição nutricional dos ingredientes adicionados segundo as instruções de preparo;
- para o cálculo da INC das declarações realizadas para os atributos “baixo”, “não contém” e “sem adição de”, deve ser considerada a contribuição nutricional dos ingredientes adicionados segundo as instruções de preparo;
- INC que não possibilite interpretação errônea pelo consumidor;
- INC que não incentive o consumo excessivo do produto;
- INC que não sugira que o produto seja nutricionalmente completo; e
- INC redigida no idioma oficial do país de consumo (espanhol ou português), sem prejuízo da existência de textos em outros idiomas.

RDC nº 26 de 2 de julho de 2015 - Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares:

- alimentos, ingredientes, aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia que contenham ou sejam derivados de alergênicos devem declarar “Alérgicos: Contém (nomes comuns dos alimentos que causam alergias alimentares)”, “Alérgicos: Contém derivados de (nomes comuns dos alimentos que causam alergias alimentares)” ou “Alérgicos: Contém (nomes comuns dos alimentos que causam alergias alimentares) e derivados”, conforme o caso;
- quando não for possível garantir a ausência de contaminação cruzada dos alimentos, ingredientes, aditivos alimentares ou coadjuvantes de tecnologia por alérgenos alimentares, deve constar no rótulo a declaração “Alérgicos: Pode conter (nomes comuns dos alimentos que causam alergias alimentares)”;
- declaração com nomenclatura comum do alérgeno;
- advertência agrupada após ou abaixo da lista de ingredientes, com caracteres legíveis (caixa alta, negrito, cor contrastando com fundo do rótulo, altura mínima de 2 mm e nunca inferior à altura da letra utilizada na lista de ingredientes); e

- ausência de alegação relacionada à ausência de alimentos alergênicos ou alérgenos alimentares.

**Figura 7.** Delineamento experimental para avaliação da rotulagem de biscoitos semidoces comercializados em MG



#### 4.9.2 Análise de dados

As frequências de amostras NC totais, por ano, por tipo de biscoito, por regulamento, bem como por requisito foram avaliadas. Também foram discriminadas as estratégias adotadas pelos fabricantes para a alegação ou não de alergênicos.

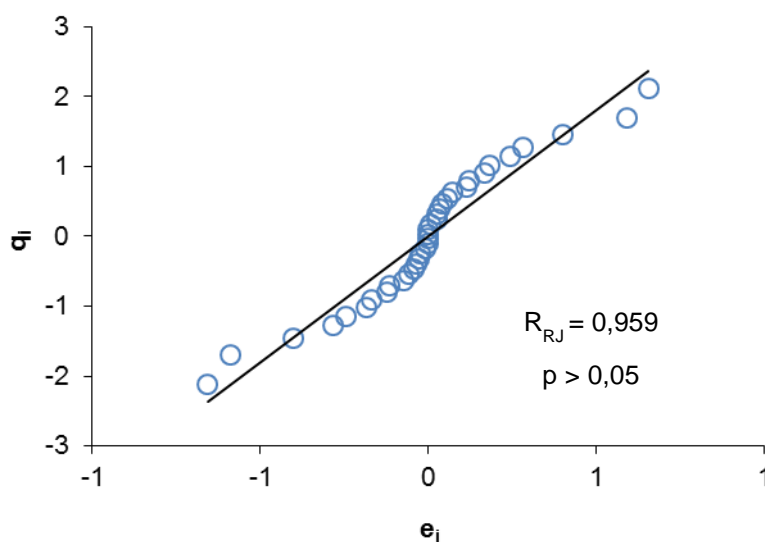
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE $\beta$ LG EM BISCOITOS SEMIDOCES

Foram obtidos resultados negativos para todas as amostras com 0 % de leite, cruas e assadas a 150 °C por 5 minutos, bem como para as matérias-primas, assegurando ausência de contaminação e adequação das práticas de fabricação dos biscoitos.

Os resultados obtidos para os diferentes tratamentos do delineamento fatorial completo 6 x 3, envolvendo diferentes condições de assamento dos biscoitos, seguiram a distribuição normal, com coeficiente de correlação de Ryan-Joiner ( $R_{RJ}$ ) de 0,959 ( $p > 0,05$ ) (**Figura 8**).

**Figura 8.** Gráfico de probabilidade da normal (Q-Q Plot) para resultados do estudo de degradação de  $\beta$ -lactoglobulina em biscoitos semidoces.



$e_i$  = resíduo;  $q_i$  = valor normal esperado,  $R_{RJ}$  = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner,  $p$  = significância.

Diferença significativa foi observada em relação aos fatores tempo e temperatura ( $p < 0,05$ ), conforme demonstrado na análise de variância da **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Análise de variância dos resultados do experimento fatorial 6 x 3

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P	Fc	Significância
Bloco	1	0,03	0,03	0,2	0,7	4,45	$p > 0,05$
Tempo	5	91,0	18,2	132,2	$5,5 \times 10^{-13}$	3,59	$p < 0,001$
Temperatura	2	2,3	1,1	8,3	$3,1 \times 10^{-3}$	2,81	$p < 0,01$
Temperatura e Tempo	10	1,2	0,1	0,9	0,6	2,45	$p > 0,05$
Tratamento	17	94,5					
Resíduo	17	2,3	0,1				
Total	35	96,8					

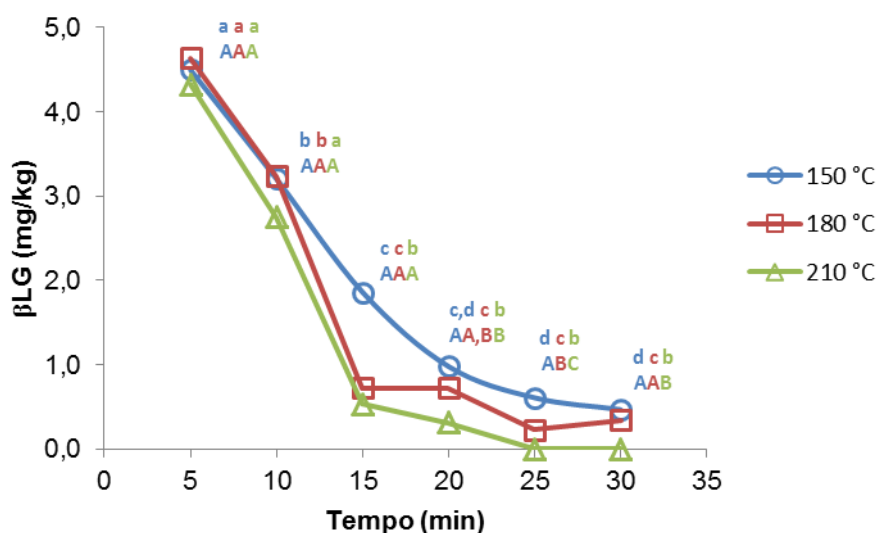
F: estatística F calculada; p = significância; Fc = estatística F crítica.

Quando os diferentes tratamentos foram discriminados pelo teste de Tukey, para a temperatura de assamento de 150 °C, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos teores de  $\beta$ LG e, conseqüentemente, na capacidade de ligação antígeno-anticorpo, quando os biscoitos foram assados durante 5, 10 e 15 minutos. O tempo de assamento de 20 minutos não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) dos tempos 15, 25 e 30 minutos, embora os dois últimos tenham sido inferiores aos demais ( $p < 0,05$ ) e não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Para a temperatura de 180 °C, embora um decaimento significativo tenha ocorrido nos tempos 5, 10 e 15 minutos ( $p < 0,05$ ), nos demais tempos houve uma estabilização nos teores de  $\beta$ LG, ou seja, na antigenicidade desta proteína ( $p > 0,05$ ). A 210 °C, os teores não diferiram significativamente entre 5 e 10 minutos ( $p > 0,05$ ), havendo um decaimento significativo aos 15 minutos ( $p < 0,05$ ), seguido de estabilização ( $p > 0,05$ ) (**Figura 9**).

Na comparação das médias estimadas para as diferentes temperaturas, num mesmo tempo de assamento, não foram evidenciadas diferenças significativas entre as três temperaturas avaliadas nos tempos 5, 10 e 15 minutos ( $p > 0,05$ ). No tempo 20 minutos, houve diferença significativa entre as temperaturas 150 °C e 210 °C, com decaimento nesta última ( $p < 0,05$ ),

embora a temperatura de 180 °C não tenha diferido das demais ( $p > 0,05$ ). Na condição de 25 minutos, houve tendência significativa de menores teores de  $\beta$ LG, ou seja, de redução na antigenicidade, para as maiores temperaturas ( $p < 0,05$ ). Em 30 minutos de assamento somente a temperatura 210 °C diferiu significativamente das demais ( $p < 0,05$ ). Cumpre destacar que, nesta temperatura, com tempos 25 e 30 minutos de assamento, não houve detecção de  $\beta$ LG por ligação antígeno-anticorpo, empregando kit de ELISA, o que sugeriu uma redução total do potencial antigênico da referida proteína (**Figura 9**).

**Figura 9.** Perfil de degradação da  $\beta$ -lactoglobulina sob diferentes condições de tempo e temperatura de assamento em experimento fatorial completo 6 x 3



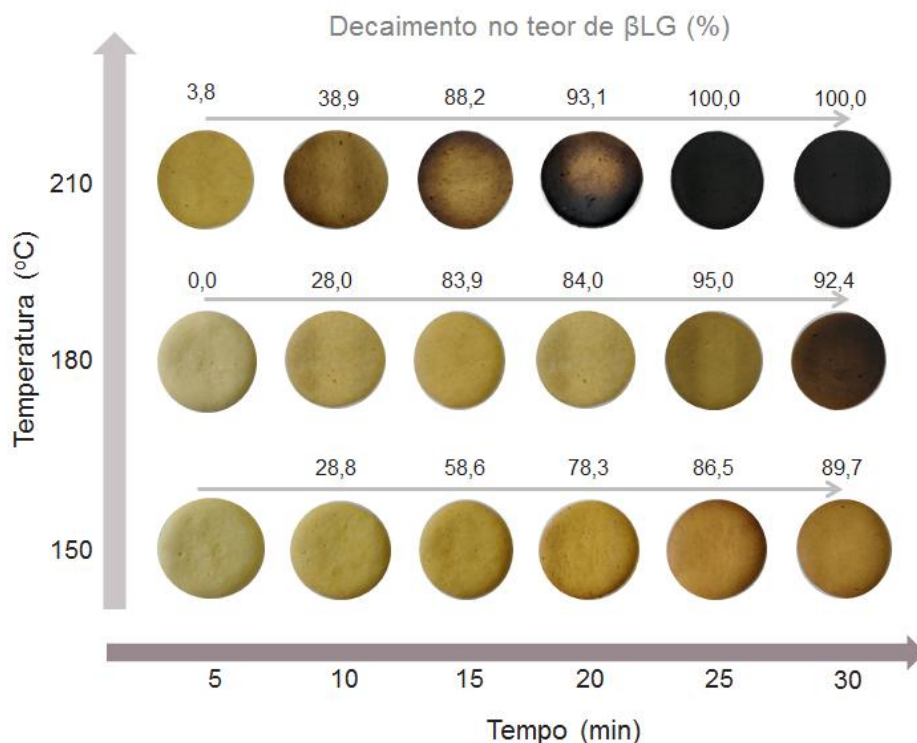
Médias indicadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Letras minúsculas indicam a comparação de diferentes tempos numa mesma temperatura, enquanto letras maiúsculas representam a comparação de diferentes temperaturas num mesmo tempo.

O perfil de decaimento nos teores de  $\beta$ LG foi estimado em relação ao teor quantificado para o tempo de 5 minutos de assamento na temperatura mais branda (150 °C). Com 10 minutos de assamento o percentual de redução de foi similar para todas as temperaturas estudadas, representado por 28,8; 28,0 e 38,9 %, respectivamente, nas temperaturas 150, 180 e 210 °C. Em 15 minutos de assamento, a tendência foi concordante nas temperaturas de 180 °C e 210 °C, com reduções de 83,9 % e 88,2 %, respectivamente. No



referido tempo, houve maior preservação da proteína na temperatura de 150 °C, na qual o decaimento no teor de  $\beta$ LG foi de 58,6 %. A partir de 20 minutos, cada condição de temperatura assumiu um perfil estável. Reduções de 78,3 % em 20 minutos, 86,5 % em 25 minutos e 89,7 % em 30 minutos foram observadas na temperatura de 150 °C. Sob 180 °C, foram evidenciadas quedas de 84,0; 95,0 e 92,4 % nos tempos 20, 25 e 30 minutos, respectivamente. Finalmente, na condição de 210 °C um decaimento de 93,1 % foi evidenciado com 20 minutos de assamento, sendo que a partir de 25 minutos a proteína não apresentou mais nenhuma interação com os anticorpos do kit, não sendo mais detectada, o que representou 100 % de degradação (Figura 10).

**Figura 10.** Perfil dos produtos assados sob diferentes condições de tempo e temperatura de assamento e percentual de decaimento no teor de  $\beta$ -lactoglobulina em relação ao teor obtido no tempo de 5 minutos de assamento a 150 °C



DOWNS & TAYLOR (2010) avaliaram por meio de três kits de ELISA “sanduíche” comerciais o efeito do processamento térmico na detecção de resíduos de proteínas totais do leite, caseína e  $\beta$ LG em massa folheada, adicionada de leite em pó nos níveis 0, 10, 25, 50, 100, 250 mg/kg. O assamento, sob uma única condição de tempo e temperatura (30 minutos a 190 °C), foi um dos processamentos considerados pelos referidos autores. Os resultados foram submetidos à análise de variância para dois fatores com nível de significância de  $\alpha=0,05$ , embora não tenha sido reportado um teste para discriminação dos tratamentos. Para cada kit comercial, dois extratos independentes foram preparados e analisados em triplicata. A  $\beta$ LG teve o seu teor reduzido em aproximadamente 96 %, correspondendo à proteína que apresentou maiores perdas depois de submetida ao tratamento térmico, sendo detectada apenas nas duas concentrações de leite mais altas.

MONACI et al. (2011) também investigaram a influência do assamento de biscoitos do tipo cookies na detecção de proteínas alergênicas do leite, por quatro kits de ELISA comerciais, para proteínas totais, caseína e  $\beta$ LG. Amostras adicionadas de padrão de leite em pó desnatado no nível de 1000 mg/kg foram estudadas. Os cookies foram assados numa única temperatura de 180 °C por 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos. Os pesquisadores relataram diminuição na detecção de todos alérgenos estudados com aumento do tempo de assamento, cada cookie foi analisado em triplicata, embora a análise estatística não tenha sido apresentada. Diminuição do teor de  $\beta$ LG, de aproximadamente 80 % a 90 %, foi evidenciada nos primeiros 9 minutos de assamento. A partir desse ponto, a redução ocorreu numa taxa progressiva, embora mais suave, sendo que após 25 minutos de assamento os níveis residuais de  $\beta$ LG, de aproximadamente 5 %, se mantiveram constantes.

KHUDA et al (2012) também avaliaram o efeito do processamento térmico na determinação de alergênicos em biscoitos tipo cookies empregando kits de ELISA. As amostras estudadas foram adicionadas de MRC de leite em pó desnatado nos níveis 0; 0,25; 5; 10; 25; 100; e 500 mg/kg. Foi avaliada uma única temperatura e dois tempos de assamento (190 °C a 25 e 30 minutos). Para cada amostra, quatro alíquotas foram utilizadas para quantificar a

concentração do alérgeno. Análise de variância fator único foi empregada. Todos os kits estudados apresentaram menor recuperação dos alérgenos após o assamento. Para  $\beta$ LG os autores encontraram reduções médias para todos os kits e níveis de 35,2 % e de 93,8 % nos tempos de 25 minutos e 30 minutos, respectivamente. Dentre os kits utilizados neste estudo, encontra-se o kit específico para  $\beta$ LG da R-Biopharm, que não detectou esse analito nos biscoitos assados por 25 e 30 minutos a 190 °C.

Embora os trabalhos reportados não tenham avaliado a degradação da  $\beta$ LG em condições de tempo e temperatura combinadas e tenham considerado concentrações de leite em níveis superiores ao avaliado no presente estudo, pode-se dizer que tais pesquisas corroboram com os achados do presente trabalho no que tange à influência do tratamento térmico na detecção da referida proteína e em sua antigenicidade. O nível de redução de  $\beta$ LG associou-se com o tempo de assamento no qual os biscoitos foram submetidos, sendo ponto crítico o tempo 15 minutos de assamento.

O perfil de degradação de  $\beta$ LG exposto no presente estudo é justificado pelas alterações conformacionais na estrutura das proteínas decorrentes da desnaturação térmica (CULBERTSON et al., 2005). Sabe-se que a  $\beta$ LG sofre desnaturação entre 70,5 °C e 81,5 °C (MONACI et al., 2006), faixa inferior a estudadas no presente trabalho e praticadas no processamento de biscoitos.

## **5.2 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE $\beta$ LG EM BISCOITOS SEMIDOCES**

### **5.2.1 Abordagem quantitativa**

A linearidade e efeitos de matriz não foram estudados na abordagem da validação quantitativa do presente estudo, pois os padrões para construção da curva e o modelo de regressão foram fornecidos pelo fabricante do kit.

Previamente à estimativa das recuperações e DP, para avaliação da veracidade e precisão, respectivamente, os *outliers* foram diagnosticados pelo teste de Grubbs, sendo identificados dois pontos dispersos nos níveis 0,5; 1,5 e

3,0 mg/kg e quatro pontos dispersos no nível 1,0 mg/kg ( $p < 0,05$ ). Os resultados seguiram a distribuição normal ( $p > 0,05$ ) segundo teste de Ryan-Joiner e também foram considerados homoscedáticos ( $p > 0,05$ ).

As porcentagens de recuperação média, DPR<sub>r</sub> e DPR<sub>R</sub> calculados para cada nível de concentração avaliado encontram-se apresentados na **Tabela 7**. Observou-se que os valores estimados para veracidade e precisão não cumpriram com requisitos mínimos de desempenho, de forma que o kit validado não foi considerado adequado para o propósito de quantificação de  $\beta$ LG.

**Tabela 7.** Médias de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, obtidos na determinação de  $\beta$ -lactoglobulina em biscoito semidoce pelo kit de ELISA RIDASCREEN FAST  $\beta$ -Lactoglobulin<sup>®</sup>

Concentração (mg/kg)	N	Premissas		Veracidade	Precisão	
		R <sub>RJ</sub>	F <sub>L</sub>	R <sub>m</sub> (%)	DPR <sub>r</sub> (%)	DPR <sub>R</sub> (%)
0,25	9	0,961	-	159,0	190,5	-
0,5	18	0,973	0,2	128,7	62,1	66,1
1,0	16	0,947	0,3	150,6	25,1	25,1
1,5	18	0,978	5,1	213,5	37,4	37,4
3,0	18	0,968	0,9	110,8	59,0	59,0
4,5	20	0,983	$3,8 \times 10^{-2}$	156,1	52,4	53,0
9,0	20	0,981	0,3	<b>93,3</b>	33,7	34,0
13,5	20	0,958	0,8	73,2	35,5	35,5

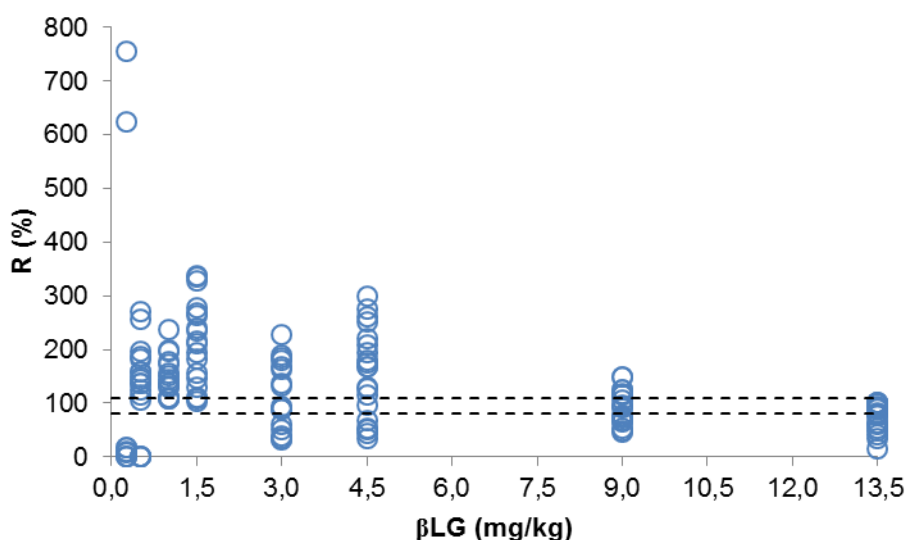
n: número de observações após tratamento de *outliers* pelo teste de Grubbs; R<sub>m</sub>: porcentagem de recuperação média, com critério de aceitabilidade de 80 % a 110 % para amostras com teores maiores ou iguais a 10  $\mu$ g/kg (EC, 2002); R<sub>RJ</sub>: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner para normalidade ( $p > 0,05$ ); F<sub>L</sub>: estatística F de Levene para homoscedasticidade ( $p > 0,05$ ); DPR<sub>r</sub>: desvio padrão relativo de repetibilidade, com critério de aceitabilidade máximo de 13,4; 11,8; 10,7; 10,0; 9,0; 8,5; 7,7; e 7,2 % e DPR<sub>R</sub>: desvio padrão relativo de precisão intermediária, com critério de aceitabilidade máximo de 19,7; 17,8; 16,0; 15,1; 13,6; 12,8; 11,5; e 10,8 % para os níveis 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0; 4,5; 9,0; e 13,5 mg/kg, respectivamente (EC, 2002).

Destacado em negro o único dado que atendeu os critérios de aceitabilidade.

Quando avaliada a dispersão dos resultados de recuperação individuais (**Figura 11**), observou-se que apesar do kit não cumprir com os requisitos de

recuperação na faixa de 80 % a 110 %, houve um melhor perfil na recuperação da  $\beta$ LG nos dois níveis de concentração superiores, correspondentes a 9,0 e 13,5 mg/kg.

**Figura 11.** Porcentagens de recuperação individuais obtidas na determinação de  $\beta$ -lactoglobulina em biscoito semidoce pelo kit de ELISA RIDASCREEN FAST  $\beta$ -Lactoglobulin®.



R: porcentagem de recuperação;  $\beta$ LG:  $\beta$ -lactoglobulina.

O kit foi considerado seletivo em relação aos potenciais interferentes da matriz biscoito, visto que todas as 20 replicatas de amostras analisadas, sem adição de  $\beta$ LG, tiveram resultados não detectados.

Os limites de detecção e quantificação teóricos foram estimados como 0,16 mg/kg e 0,52 mg/kg de  $\beta$ LG. Cumpre destacar, que apesar do método não ter apresentado veracidade e precisão aceitáveis, o limite de quantificação teórico coincidiu com o primeiro ponto da curva de calibração do kit, ou seja, com o LQ definido pelo fabricante.

MATSUDA et al (2006) validaram dois kits de ELISA policlonais, FASPEK e FASTKIT, para serem empregados no monitoramento oficial da rotulagem de alergênicos no Japão, visando à determinação de proteínas do ovo, leite, trigo, farinha de gergelim e amendoim, em estudo interlaboratorial,

envolvendo 10 laboratórios e seis diferentes matrizes, as quais foram adicionadas dos diferentes alérgenos no nível único de 10 mg/kg de proteína, sendo as análises feitas em duplicata. Para as proteínas do leite, as recuperações médias variaram entre 89 % e 136 %, com DPRr de 3 % a 7 % e DPRR de 12 % a 17 % para o kit FASPEK; e entre 49 % a 89 %, com DPRr de 2 % a 5 % e DPRR de 7 % a 14 % para o kit FASTKIT.

STUMR et al (2009) validaram um kit ELISA “sanduiche” policlonal, SEDIUM RD, para determinação de  $\beta$ LG, em estudo intra e interlaboratorial, envolvendo seis laboratórios. Na validação intralaboratorial, para estudo da recuperação duas matrizes sem leite foram adicionadas de  $\beta$ LG em três níveis (0,5; 1,0 e 2,0 mg/kg) e analisadas em duplicata em uma corrida analítica, resultando em recuperações de 91 % a 118 %. A precisão foi demonstrada por meio de DPRr de 9,98 % e de DPRR de 14,2 %, em estudo com três amostras, em cinco níveis, totalizando, vinte e cinco repetições. O LD e LQ foram estabelecidos em 0,06 mg/kg e 0,1 mg/kg, respectivamente. Na validação interlaboratorial foram estimados DPRr de 5,51 % a 21,7 % e DPRR de 21,7 % a 48,7 %, e estabelecidos LD de 0,07 mg/kg e LQ de 0,22 mg/kg.

DIAZ-AMIGO (2010) estudou, em processo intralaboratorial, o desempenho de diferentes kits comerciais de ELISA “sanduíche” policlonais para alérgenos do leite, sendo Neogen e Morinaga para proteínas totais do leite e Tepnel e R-Biopharm para  $\beta$ LG e caseínas. O autor descreveu o experimento de adição do MRC NIST 1549 de leite em pó desnatado em farinha de trigo no nível 500 mg/kg, mas apresentou resultados para outros níveis (250, 125, 63, 31, 16, 8 e 4 mg/kg), sugerindo que estes tenham sido obtidos por diluições sucessivas do extrato da amostra preparada. As análises foram feitas em duplicata. Considerando os resultados específicos dos kits de  $\beta$ LG, para o Tepnel somente foi detectada a proteína alergênica nos níveis 250 mg/kg e 500 mg/kg, com recuperações de 394,2 % e 234,4 %, enquanto para o R-Biopharm a  $\beta$ LG foi detectada somente nos níveis acima de 63 mg/kg, com recuperações entre 90,8 % e 109,3 %.

Neste mesmo trabalho amostras comerciais de leite integral e desnatado pasteurizado foram diluídas com tampão para 200 mg/kg. De maneira similar, resultados foram reportados para níveis de 100, 50, 25 e 13 mg/kg, sugerindo

diluições sucessivas. Neste caso não houve detecção de  $\beta$ LG pelo kit Tepnel, enquanto o R-Biopharm detectou somente os dois níveis superiores, com recuperações entre 2,9 % e 20 %. Cumpre destacar que o MRC utilizado não é certificado para proteína, mas sim para minerais e lactose, o que não justificaria seu emprego neste estudo cujos analitos representam a fração proteica. Ainda, a precisão não foi avaliada no referido estudo, que foi conduzido com um número restrito de replicatas, que não foram independentes, impedindo uma avaliação adequada do desempenho dos kits estudados. Apesar do autor ter avaliado um kit R-Biopharm para  $\beta$ LG, a detecção se deu somente nos níveis 63, 125, 250 e 500 mg/kg de leite, correspondentes a 0,22; 0,44; 0,88 e 1,75 mg/kg de  $\beta$ LG, indicando que o kit empregado não foi o mesmo objeto de estudo do presente trabalho, visto que a detecção ocorreu em níveis inferiores ao limite de 0,5 mg/kg (DIAZ-AMIGO, 2010).

CAGNASSO et al. (2014) analisaram a presença de alérgenos, como leite, soja e ovo em pré misturas de creme de caramelo, bolo, torta, pizza e nhoque (n=13). Foram utilizados kits ELISA “sanduíche” policlonais R-Biopharm Milk, R-Biopharm Soya, Neogen Soya e R-Biopharm Egg. Para leite, o kit avaliado determinou presença do alérgeno na sua faixa de quantificação (2,5 mg/kg a 67,5 mg/kg) em seis amostras, foram obtidos valores menores que 2,5 mg/kg e maiores que 67,5 mg/kg para cinco e duas amostras, respectivamente. Os autores sugeriram elevada sensibilidade e indicam o uso dos kits estudados, mas não avaliaram parâmetros para validação quantitativa e/ou qualitativa.

KATO et al. (2015), em estudo interlaboratorial, validaram kits Allergeneye ELISA Egg e Allergeneye ELISA Milk monoclonais, para serem adotados na rede oficial de monitoramento da rotulagem de alergênicos no Japão, com propósito de determinação de proteínas do leite e do ovo. Quatorze laboratórios participaram do estudo, cinco amostras diferentes foram distribuídas para cada participante e as análises foram realizadas em triplicata. Recuperações de 52,1 % a 67 % foram reportadas para o kit de leite, dentro dos critérios estabelecidos pelo governo do Japão (50 % a 150 %). A precisão estimada sob condições de reprodutibilidade foi representada por DPRR de 6,8 % a 10,5 %. O LD calculado foi de 0,2 mg/kg e o LQ foi de 0,6 mg/kg.

Comparando-se os dados do presente estudo com aqueles reportados na literatura para métodos de escopo similar, observou-se um comportamento distinto, que pôde ser justificado pelo fato de se tratarem de kits diferentes. Contudo, vale destacar que os relatos da literatura envolvem estudos mais restritos em relação ao número de níveis de concentração estudados; ao número de replicatas e forma como as mesmas foram obtidas; à formulação das amostras adicionadas, que não ocorreu por adição do analito especificamente; assim como em relação aos parâmetros de desempenho avaliados.

Em relatório de validação do kit estudado no presente trabalho, para avaliar a recuperação e o DPRr foi realizado um experimento com três matrizes diferentes bebida de soja sem adição do analito, suco de maçã 1 adicionado de 1,8 mg/kg de  $\beta$ LG e suco de maçã 2 adicionada de 12 mg/kg  $\beta$ LG analisadas em duplicata (n=6). As recuperações reportadas variaram de 94 % a 100 %. No estudo do DPRR global foram utilizadas três matrizes sendo cookies sem adição de  $\beta$ LG, suco de maçã 1 e 2 adicionados de 1mg/kg e 3 mg/kg de  $\beta$ LG, respectivamente, analisadas em duplicada em três baterias analíticas, sendo relatado DPRR de 2,4 % para as três amostras juntas. O fabricante do kit também avaliou a recuperação do kit utilizando MR NIST 1549,  $\beta$ LG, proteína do soro do leite e leite e encontrou recuperações de 101 %, 113 %, 72 % e 149 %, no entanto, não foi descrito como o ensaio foi delineado (R BIOPHARM, 2010).

Apesar de o fabricante indicar recuperação e precisão aceitáveis para o kit, em nosso estudo a utilização para quantificação de  $\beta$ LG é questionável, visto que não houve evidências de recuperação e precisão aceitáveis nessa abordagem.

### 5.2.2 Abordagem qualitativa

Resultados não detectados foram observados para todas as replicatas de amostras brancas, levando a uma TST de 100% e 0% de TFN, ou seja, a uma TCF de 100,0%. No nível 0,25 mg/kg foi estimada TFN de 30 % com TCF e TSB de 70 %; em 0,5 mg/kg foi calculada uma TFN de 20 % com TCF e TSB



de 80%; e acima de 1,0 mg/kg foram obtidos 0 % de TFN e 100 % de TCF e TSB. Foi evidenciado um perfil de decaimento da sensibilidade, pelo aumento na taxa de falsos resultados, em função da redução da concentração de  $\beta$ LG, embora a sensibilidade e seletividade tenham se apresentado satisfatórias na faixa estudada (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Taxas de falsos-negativos, falsos-positivos, de sensibilidade, de seletividade e de confiabilidade obtidas na detecção de  $\beta$ -lactoglobulina em biscoito semidoce pelo kit de ELISA RIDASCREEN FAST  $\beta$ -Lactoglobulin<sup>®</sup>

Concentração (mg/kg)	Parâmetro da Validação (%)		
	TFN/TFP	TSB/TST	TCF
<b>0</b>	<b>0,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>
<b>0,25</b>	<b>30,0</b>	<b>70,0</b>	<b>70,0</b>
0,50	20,0	80,0	80,0
1,0	0,0	100,0	100,0
1,5	0,0	100,0	100,0
3,0	0,0	100,0	100,0
4,5	0,0	100,0	100,0
9,0	0,0	100,0	100,0
13,5	0,0	100,0	100,0

TFN = taxa de falsos-negativos, para amostras positivas; TFP = taxa de falsos-positivos, para amostras negativas; TSB = taxa de sensibilidade, para amostras positivas; TST = taxa de seletividade, para amostras negativas; TCF = taxa de confiabilidade.

Destacados em negrito os níveis que se encontraram fora da região de perda de confiabilidade.

Na **Tabela 9** encontram-se relacionados os valores de ACO e CON estimados para os oito níveis de concentração estudados. A ACO variou entre 0,5 e 1,0 enquanto a CON esteve entre 0,7 e 1,0. Cumpre destacar que valores máximos (iguais a 1,0) foram alcançados no nível 0 mg/kg e a partir do nível 1,0 mg/kg, indicando padronização adequada do método nesta faixa e, conseqüentemente, precisão sob a ótica qualitativa.

**Tabela 9.** Acordância e concordância estimadas na detecção de  $\beta$ -lactoglobulina em biscoito semidoce pelo kit de ELISA RIDASCREEN FAST  $\beta$ -Lactoglobulin®

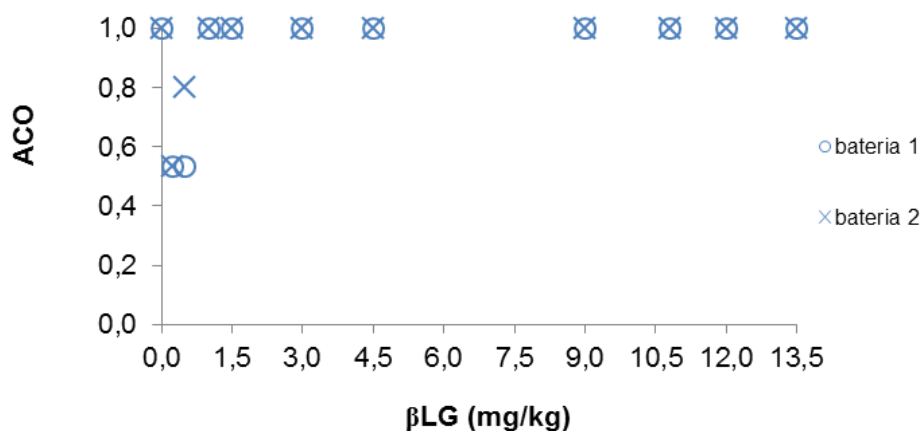
Concentração (mg/kg)	ACO		COM
	Bateria analítica 1	Bateria analítica 2	
<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>
<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>
0,50	0,5	0,8	0,7
1,0	1,0	1,0	1,0
1,5	1,0	1,0	1,0
3,0	1,0	1,0	1,0
4,5	1,0	1,0	1,0
9,0	1,0	1,0	1,0
13,5	1,0	1,0	1,0

ACO = acordância; CON: concordância.

Destacados em negrito os níveis que se encontraram fora da região de perda de confiabilidade.

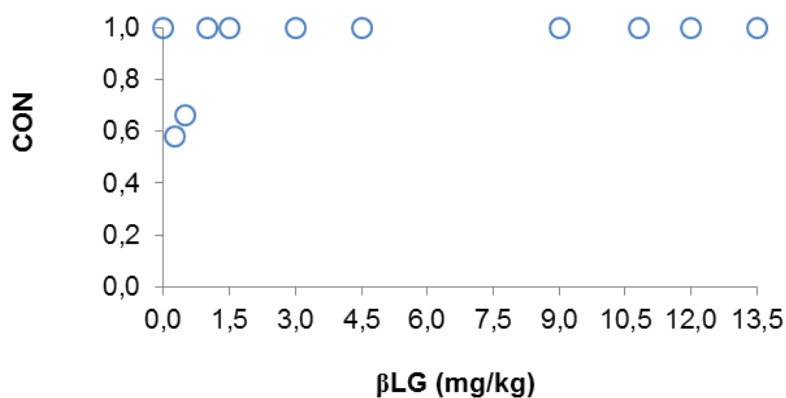
Nas **Figuras 12 e 13**, encontram-se apresentadas as representações gráficas dos valores de ACO e CON estimados em função da concentração de  $\beta$ LG. Observou-se um perfil adequado de decaimento nos valores de CON na RPC, seguido de recuperação.

**Figura 12.** Perfil de resultados de acordância na faixa de concentração de  $\beta$ -lactoglobulina avaliada



ACO: acordância;  $\beta$ LG:  $\beta$ -lactoglobulina.

**Figura 13.** Perfil de resultados de concordância na faixa de concentração de  $\beta$ -lactoglobulina avaliada.

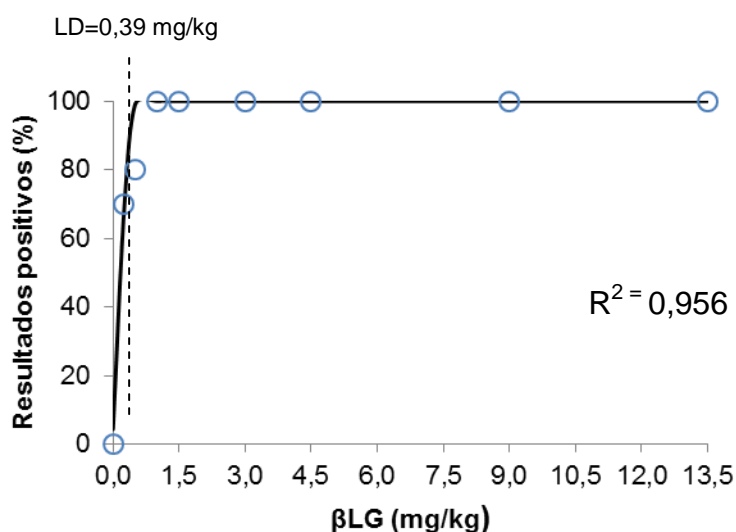


CON: concordância;  $\beta$ LG:  $\beta$ -lactoglobulina.

A curva de desempenho foi construída, por regressão logística não linear, empregando o modelo sigmóides probito, que apresentou perfil do gráfico de resíduos não tendencioso. Os limites da RPC foram, então, calculados como os níveis de concentração correspondentes a 5 % e 95 % de

resultados positivos, resultando em 0,01 mg/kg e 0,39 mg/kg, respectivamente. A partir desta faixa, o LD foi estimado como o extremo superior da RCP, ou seja, 0,39 mg/kg, **(Figura 14)**, próximo ao limite fornecido pelo fabricante do kit. Apesar da alergia não ser dose dependente, o LD estimado foi considerado suficiente em relação ao limite estabelecido pelo Japão de 10 mg/kg de proteína total, equivalente a 1 mg/kg de  $\beta$ LG (SAKAI et al., 2013). Também foi suficiente para detectar a dose limite estimada por ALLEN et al. (2014) de 0,1 mg de proteína, correspondente a 0,01 mg de  $\beta$ LG, visto que a concentração de 0,39 mg/kg corresponde à detecção de 0,00039 mg de  $\beta$ LG na alíquota de 1 g de amostra de biscoito.

**Figura 14.** Curvas de desempenho obtidas por regressão não linear do tipo probito para  $\beta$ -lactoglobulina



$\beta$ LG:  $\beta$ -lactoglobulina; - - - : concentração correspondente ao limite superior da região de perda de confiabilidade, ou seja, ao limite de detecção (LD).

O kit avaliado apresentou, ainda, seletividade em relação a outra proteína alergênica, a ovalbumina, visto que mesmo em quantidades significativas do potencial interferente as taxas de falsos resultados e de confiabilidade não foram alteradas na presença **(Tabela 10)**.

**Tabela 10.** Taxas de falsos-positivos, de falsos-negativos e de confiabilidade obtidas para amostras brancas e adicionadas de  $\beta$ -lactoglobulina, em nível com 100 % de confiabilidade, na presença de ovalbumina

<b>Concentração (mg/kg)</b>	<b>TFP (%)</b>	<b>TFN (%)</b>	<b>TCF (%)</b>
OVA (135 mg/kg)	0	-	100
OVA (135 mg/kg) $\beta$ LG (1,0 mg/kg)	-	0	100

OVA: ovalbumina;  $\beta$ LG:  $\beta$ -lactoglobulina; TFP: taxa de falsos-positivos; TFN: taxa de falsos-negativos; TCF: taxa de confiabilidade; - não se aplica

Na literatura somente um estudo que avaliou kit de ELISA para detecção de alérgeno  $\beta$ LG considerando parâmetros de desempenho numa abordagem qualitativa. STUMR et al. (2009) validaram kit ELISA “sanduiche” policlonal para detecção desta proteína alergênica, em estudo interlaboratorial, com TFP de 1,7 %, para os níveis de 200 e 600  $\mu$ l de leite.

Recentemente, as informações qualitativas têm sido valorizadas no contexto das análises laboratoriais, por fornecerem resultados rápidos, objetivos, com baixo custo, simplicidade e minimização de erros (GONDIM et al., 2011). Neste contexto, embora a validação de métodos que fornecem respostas binárias ainda seja pouco explorada, a referida abordagem pode e deve ser selecionada nos casos em que a detecção é suficiente para tomada de decisão, como o caso de proteínas alérgicas em alimentos.

### **5.3 AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM DE AMOSTRAS COMERCIAIS**

Para os rótulos de 2014-2015, 44,4% (n=4) das amostras avaliadas apresentaram alguma NC frente a regulamentação nacional para rotulagem de alimentos. Já em 2016, foram observadas 77,7% (n=7) de NC. Considerando-se somente as regulamentações válidas em ambos os períodos, foi observado melhoria nas informações declaradas nos rótulos, com redução do percentual de NC, visto que 3,7 % de NC foram identificadas em 2014-2015 e 2,0 % em 2016.

Especificamente para a RDC n°259 de 2002, RDC n°359 de 2003, RDC n°360 de 2003 e RDC n°54 de 2012 foram encontrados, respectivamente, em

2014-2015, 33,3% (n=3), 0 % (n=0), 33,3 % (n=3) e 22,2 % (n=2) de NC, enquanto no ano de 2016 foram estimados 11,1 % (n=1), 0 % (n=0), 22,2 % (n=2) e 11,1 % (n=1).

As principais NC encontradas para RDC nº259 de 2002, foram indicação inadequada de corante ou aroma artificial na denominação de venda 22,2 % (n=2) no ano de 2014 e 2015 e 11,1 % (n=1) em 2016. O emprego de indicação terapêutica ou informação que possa induzir o consumidor ao erro foi o encontrado em uma amostra 11,1 % (n=1) nos anos de 2014 e 2015.

Para a RDC nº360 de 2003, foram encontrados inadequações relacionados à especificação de valor energético por porção em quilocalorias (Kcal) e kilojoule (Kj) e apresentação do valor diário em percentual em 33,3 % (n=3) e 11,1 % (n=1), para os anos 2014-2015 e 2016, respectivamente.

Em relação a Informação Nutricional Complementar RDC nº 54 de 2012, no período de 2014-2015 foram identificadas NC em 33,3 % (n=3) no que tange à INC possibilitar a interpretação errônea ou enganosa do consumidor, enquanto 22,2 % (n=2) das amostras incentivou o consumo excessivo do produto e sugeriu que o alimento era nutricionalmente completo. No ano seguinte, uma das marcas que apresentaram inadequação em 2014-2015, se manteve NC.

Apesar da não obrigatoriedade da declaração de alergênicos no período de 2014-2015, 55,5 % (n=5) dos rótulos advertiu sobre a presença de leite nos produtos, 44,4 % (n=4) dos rótulos possuíam leite na sua lista de ingredientes, destes 33,3 % (n=3) apesar de conterem leite na lista de ingredientes não advertiram quanto sua presença.

Na avaliação da rotulagem de alergênicos RDC nº 26 de 2015, feita para os produtos coletados em 2016, apesar da legislação ter dado prazo de um ano para indústria adequar a nova resolução, observou-se que 33,3 % (n=3) dos produtos não continham a declaração de alergênicos em seus rótulos. Duas marcas continham leite e derivados em sua lista de ingredientes, no entanto, não declaravam essas substâncias como alergênicos, caracterizando 22,2 % de NC.

**Tabela 11.** Lista de verificação da rotulagem de biscoitos semidoces em relação aos requisitos da legislação brasileira

Requisito regulamentado	Marca																	
	2014-2015									2016								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	A	B	C	D	E	F	G	H	I
RDC nº259/2002																		
Denominação de venda do alimento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Lista de ingredientes	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Conteúdos líquidos	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Identificação da origem	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Nome ou razão social e endereço do importador, no caso de alimentos importados	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Identificação do lote	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Declaração de aditivo/número do INS.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Indicação de corante e aroma artificial na denominação de vendas	C	C	C	C	NC	C	NC	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	C	C
Indicação terapêutica ou informação que não induza o consumidor a erro	C	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Prazo de validade	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Instrução para o preparo/uso	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Condições especiais de conservação	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
RDC nº360/2003																		
Declaração de valor energético e nutrientes	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Apresentação correta da ordem dos componentes da informação nutricional	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Apresentação correta da tabela de informação nutricional	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Conversão kcal para Kj	C	C	C	C	C	C	NC	NC	C	NC	C	C	C	C	C	C	C	C
Porcentagem de valor diário (%VD)	C	C	C	C	C	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	C
Especificação de macronutrientes por porção em gramas (g)	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Especificação do conteúdo de sódio por porção em miligramas (mg)	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
As vitaminas e minerais, sempre que estiverem presentes em quantidade igual ou maior a 5 % da IDR por porção indicada no rótulo, podem ser declaradas	NA	NA	NA	C	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	C	NA	NA	NA	NA	NA
<b>RDC nº 359/2003</b>																		
Informação da medida caseira	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
<b>RDC nº 54/2012</b>																		
Quantidade do nutriente sobre o qual foi feita uma INC declarada na tabela de informação nutricional	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Valores estabelecidos para o atributo “não contém”, declarados na tabela de informação nutricional como “zero”, “0” ou “não contém”	C	C	C	C	NA	C	C	C	C	C	C	C	C	NA	C	C	C	C
Indicação na tabela de informação nutricional da quantidade de açúcares abaixo dos carboidratos, para uma INC sobre a quantidade de açúcares	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	C	C	NA	NA	NA
A INC refere-se ao alimento pronto para o consumo, preparado, quando for o caso, de acordo com as instruções de preparo indicadas pelo fabricante, sempre que estas propriedades não sejam perdidas	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Quando rótulo apresentar INC de características inerentes ao alimento há próximo à declaração, caracteres de igual realce e visibilidade, de que todos os alimentos daquele tipo possuem essas características.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
INC que não possibilite interpretação errônea pelo consumidor	C	C	C	<b>NC</b>	C	C	C	<b>NC</b>	C	C	C	C	<b>NC</b>	C	C	C	C	C
INC que não incentive o consumo excessivo do produto	C	C	C	<b>NC</b>	C	C	C	C	C	C	C	C	<b>NC</b>	C	C	C	C	C



INC que não sugira que o produto seja nutricionalmente completo	C	C	C	<b>NC</b>	C	C	C	C	C	C	C	C	<b>NC</b>	C	C	C	C	C
INC redigida no idioma oficial do país de consumo (espanhol ou português), sem prejuízo da existência de textos em outros idiomas	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
<b>Lei nº 10.674/2003</b>																		
Inscrições "contém Glúten" ou "não contém Glúten"	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
<b>Portaria nº 157/2002 do INMETRO</b>																		
Apresentação da indicação quantitativa do conteúdo líquido	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Dimensões mínimas dos caracteres alfanuméricos das indicações quantitativas do conteúdo líquido	C	C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
<b>RDC nº 26, de 2 de Julho de 2015</b>																		
Indicação da presença de alergênico: "Alérgicos contém"	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	C	<b>NC</b>	C	C	C	<b>NC</b>	C	<b>NC</b>	C
Indicação de precaução da presença de alergênico por contaminação cruzada "Alérgicos pode conter"	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	C	<b>NC</b>	C	C	C	<b>NC</b>	C	<b>NC</b>	C
Nomenclatura comum do alergênico	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	C	C	C	C	C	<b>NC</b>	C	<b>NC</b>	C
Adequação quanto a formatação da advertência (caixa alta, negrito, cor contrastando com fundo do rótulo, altura mínima de 2mm e nunca inferior à altura da letra utilizada na lista de ingredientes)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	C	C	C	C	C	<b>NC</b>	C	<b>NC</b>	C
Adequação quanto ao local da declaração dos alergênicos, após ou abaixo, da lista de ingredientes	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	C	C	C	C	C	<b>NC</b>	C	<b>NC</b>	C
Declaração da ausência de alimentos alergênicos ou alergênicos alimentares	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Declaração de leite</b>																		
Possui leite e/ou derivados na lista de ingredientes	C	<b>NC</b>	<b>NC</b>	<b>NC</b>	<b>NC</b>	C	<b>NC</b>	C	C	C	<b>NC</b>	<b>NC</b>	<b>NC</b>	<b>NC</b>	C	<b>NC</b>	C	C

C: conforme; NC: não conforme; NA: não aplicável; INS: Sistema Internacional de Numeração; IDR: ingestão diária recomendada; VD: valores diários; INC: informação nutricional complementar.

Dados sobre *recalls* realizados no ano de 1999 pelo FDA nos EUA, envolvendo alimentos comercializados contendo alérgenos não declarados, demonstraram que dentre 659 produtos analisados, 236 (36 %) foram recolhidos por conter um ou mais alérgeno não declarado e destes 15 % eram produtos de panificação (VIERK et al., 2002). As principais não conformidades encontradas foram omissão de ingrediente alergênico (51 %), contaminação cruzada durante o processamento (40 %) e erros por parte do fornecedor de ingredientes ou empregados da indústria (5 %).

Dados mais recentes do FDA demonstraram que, mesmo nos EUA onde a legislação de rotulagem está estabelecida desde 2006, houve aumento do número de alimentos comercializados sem declaração de alergênicos no período de 2008 a 2012. Os produtos de panificação, como biscoitos e bolos, foram os alimentos mais frequentemente encontrados com inadequações, representando 30,5 % dos produtos analisados (FDA, 2004; FDA, 2013). Dentre os ingredientes alergênicos, o leite foi o principal alergênico não declarado (FDA, 2004; FDA, 2013).

Para que o manejo da APLV possa ser conduzido de maneira segura, por todos os envolvidos na cadeia produtiva de alimentos, é importante que a avaliação da rotulagem esteja associada à determinação de proteínas alergênicas. Esta constitui ferramenta primordial para garantia do controle de alimentos alérgenos, visando a segurança e saúde dos indivíduos alérgicos.

## 6. CONCLUSÕES

O estudo de degradação de  $\beta$ LG em biscoitos semidoces submetidos a diferentes tratamentos térmicos demonstrou redução significativa do teor de  $\beta$ LG e, conseqüentemente, de sua antigenicidade com 15 minutos de assamento em todas as temperaturas estudadas, representando o ponto crítico do processamento térmico em estudo. Considerando que após o tratamento térmico os níveis de  $\beta$ LG são residuais, no monitoramento do referido alérgeno em biscoitos, deve-se optar por kits ELISA com características de desempenho como sensibilidade, seletividade e baixo LD, que garantam a detecção da substância em quantidades traços/residuais.

A validação do kit de ELISA comercial para determinação de  $\beta$ LG em biscoitos semidoces, empregando abordagem quantitativa, não apresentou desempenho satisfatório, para os parâmetros recuperação, repetibilidade, e precisão intermediária, embora LQ teórico tenha coincidido com o primeiro ponto da curva de calibração do kit. O kit validado não foi considerado adequado para o propósito de quantificação de  $\beta$ LG.

A aplicabilidade do kit na detecção de  $\beta$ LG em biscoitos semidoces foi confirmada por meio da validação numa abordagem qualitativa, sendo demonstrada sensibilidade, seletividade, adequadas taxas de falsos resultados, precisão, incerteza e LD.

Um número significativo de NC foi identificado na avaliação da rotulagem de biscoitos semidoces, quanto aos requisitos para rotulagem de alergênicos, embora em relação às demais legislações o perfil foi de melhora.

Para que o manejo da APLV possa ser conduzida de forma segura, é importante que a avaliação da rotulagem esteja associada à determinação de proteínas alergênicas. Esta constitui ferramenta primordial para garantia do controle de alimentos alérgenos, visando a segurança e saúde dos indivíduos alérgicos.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. p.564. Elsevier Brasil, 2008.

ABNT. **ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 - Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS: 31 p. p. 2005.

ASBAI. Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia. **Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2007**. Rev. bras. alerg. Imunopatol, vol. 31, n. 2, 2008.

ASBAI. Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia. **Guia prático de diagnóstico e tratamento da Alergia às Proteínas do Leite de Vaca mediada pela imunoglobulina E**. Rev. bras. alerg. Imunopatol, vol. 35, n. 6, 2012.

ABIMAPI. Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães e Bolos industrializados. **Anuário 2015**. Disponível em: <http://www.abimapi.com.br/>. Acesso em: 12/11/2015.

AIMUTIS, W.R. **Bioactive Properties of Milk Proteins with Particular Focus on Anticariogenesis**. Journal of Nutrition, v. 134, p. 989-995, 2004.

AKIYAMA, H.; IMAI, T.; EBISAWA, M. **Japan food allergen labelling regulation – history and evaluation**. Food Nutr Res, vol. 62, p.139-171, 2011.

ALLEN, K.J. et al. **Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL 2.0): Clinical implications**. Allergy, v. 133, n. 1, p. 156-164, 2014.

ALTERNATIVE Medicine Review. **Whey Protein**. v. 13, n. 4, 2008.

ÁLVAREZ, J.R.; BONFANTE, L.C.H.; CANO, J.M. **Factores epidemiológicos en la inmunopatogénesis de la alergia a los alimentos.** Salud Uninorte. Barranquilla, v. 25, n. 2, p. 258-279, 2009.

ALVES, M.P. et al. **Soro de Leite: Tecnologias para o Processamento de Coprodutos.** Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.

AQUINO, V. **Estudo da estrutura de massas de pães elaboradas a partir de diferentes processos fermentativos.** 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BAUMANM, D.E. et al. **Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk.** Journal of Dairy Science, v. 89, n. 4, p. 1235–1243, 2006.

BENITES, A.J. **Implementação e validação do método de detecção de alergénios em alimentos por PCR em tempo real no Laboratório SGS.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia: Universidade Nova de Lisboa, 122 p, 2016.

BERIN, M. C.; SICHERER, S. Food allergy: mechanisms and therapeutics. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 6, p. 794-800, 2011.

BEZERRA, J.R.M.V. et al. **Introdução à tecnologia de leite e derivados.** Paraná: Editora: UNICENTRO, p. 1-24, 2010.

BINDSLEV-JENSEN, C. et al. **Threshold levels for allergenic foods.** Allergy, v. 57, p. 741-746, 2002.

BLOOM, K.A. et al. **Effect of heat treatment on milk and egg proteins allergenicity.** Pediatr. Allergy Immunol, v. 25, p. 740–746, 2015.

BOAS, M.B.V. et al. **Alergia alimentar: uma abordagem sobre as proteínas lácteas e os principais tratamentos físico-químicos e enzimáticos aplicados para reduzir a antigenicidade: revisão da literatura** J Health Sci Inst, vol. 32 n. 3, p. 308-13, 2014.

BOYCE, J. A. et al. **Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Summary of the NIAID- Sponsored Expert Panel Report.** Nutrition, v. 27, n. 2, p. 253-267, 2011.

BRANDTZAEG, P. **Food allergy: separating the science from the mythology.** Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, v. 7, n. 7, p. 380-400, 2010.

BRANUM, A.M.; LUKACS, S.L. **Food Allergy Among U.S. Children: Trends in Prevalence and Hospitalizations.** NCHS - Data Brief, n. 10, Out. 2008.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior. **Patente 9905597 - Composição de um biscoito doce.** Brasília, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 259, de 20 de Setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20 set. 2002a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do leite tipo A, Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 2002b, Seção 1, p. 13.

BRASIL. LEI Nº 10.674, DE 16 DE MAIO DE 2003. **Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 16 mai. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 360, de 23 de Dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 23 dez. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº. 359, de 23 de Dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para fins de Rotulagem Nutricional.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 23 dez. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 263, de 22 de Setembro de 2005. Regulamento Técnico para Produtos de Cereais, Amidos, Farinhas e Farelos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 22 set. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 54, de 12 de Novembro de 2012. Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 12 nov. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Proposta de Resolução de Diretoria Colegiada que dispõe sobre Rotulagem de Alergênicos em Alimentos.** Brasília, 09 de jun. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamentação da Rotulagem de Alimentos Alergênicos.** Brasília, 15 e 16 de abr. 2014a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Proposta de Consulta Pública referente à RDC que dispõe sobre rotulagem de alergênicos em alimentos.** Brasília, 29 de mai. 2014b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 29/2014 - Rotulagem de Alergênicos em Alimentos.** Brasília. 2014c. Disponível em: <[http://formsus.datasus.gov.br/site/resultado.php?id\\_aplicacao=16061](http://formsus.datasus.gov.br/site/resultado.php?id_aplicacao=16061)> Acesso em: 02 nov. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – **RDC nº 26, de 02 de Julho de 2015. Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 26 jul. 2015a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Perguntas e Respostas sobre Rotulagem de Alimentos Alergênicos.** Brasília, jul. 2015b.

BRITO, M.A. *et al.* **Composição do leite.** Agência de Informação da EMBRAPA. Agronegócio do Leite. 2011. Disponível em <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_128\\_217\\_20039243.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_217_20039243.html)> Acesso em: 28 ago. 2015.

BU, G.; LUO, Y.; ZHENG, Z.; ZHENG, H. **Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in whey protein isolate.** Food Agric. Immunol, vol. 20,p. 195–206, 2009.

BURKS, et al. **ICON: Food Allergy.** J Allergy Clin Immunol, v. 129, n. 4, 2012.

CAGNASSO, C.E. et al. **Métodos electroforético e inmunoquímicos para detectar proteínas de leche, soja y huevo en premezclas comerciales.** Rev. Chil. Nutr. v. 41, n. 4, 2014.



CAUVAIN, S. P; YOUNG, L, S. **Baked products: Science, technology and practice**. Oxford, UK: Wiley – Blackweel, p. 35-98; 120-167, 2006. ISBN: 978-1-4051-2702-8.

CHAMON, R. **Como montar uma fábrica de biscoitos**. Ideias de negócios. SEBRAE. 2015.

CHEVALLIER, S. et al. **Structural and Chemical Modifications of Short Dough During Baking**. Journal of Cereal Science, v. 35, p. 1-10, 2002.

CHICÓN, R. et al. **Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of beta-lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high pressure treatments**. J Dairy Sci, vol. 91, p. 928-38, 2008.

COELHO, O. A. M. **Ractopamina em carne suína: validação de método por ensaio de imunoadsorção enzimática e estudo de ocorrência**. 2016. 119. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Belo Horizonte.

COMPANYÓ, R. et al. **Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 395, n.4, p. 877-891, 2009.

CONCEIÇÃO, S.I.O.; et al. **Consumo alimentar de escolares das redes pública e privada de ensino em São Luís, Maranhão**. Revista de Nutrição, v. 23, n. 6, p. 993-1004, 2010.

COSTA, J. et al. **Alergênicos Alimentares: O que são, o que Provocam e como detectá-los?** Química, v. 127, p. 33-38, 2012.

CULBERTSON, J.D. et al. **Handbook of food science, technology, and engineering**. Broken Sound Parkway NW: Taylor & Francis Group. 2006.

DAVIDSON, I. **Biscuit Baking Technology: Processing and Engineering Manual**. In: Process Guide: Marie Biscuits. Elsevier, 2015.

DECKWART, M.; et al. **Development of a Sensitive ELISA for the Detection of Casein Containing Fining Agents in Red and White Wines**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 62, p. 6803-6812, 2014.

DIAZ-AMIGO, C. **Towards a Comprehensive Validation of ELISA Kits for Food Allergens. Case 2-Milk**. Food Anal. Methods, n. 3, p. 351-356, 2010.

DIAZ-AMIGO, C.; POPPING, B. **Analytical Testing as a Tool for the Enforcement of Future Regulatory Thresholds for Food Allergens**. Journal of AOAC International, v. 93, n. 2, p. 434-441, 2010.

DOURADO, L. **Participação das Citocinas na Aversão e Alergia Alimentar Induzida à Ovalbumina em Camundongos**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

DOWNS, M.L.; TAYLOR, S.L. **Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix**. Journal of agricultural and food chemistry, v. 58, n. 18, p. 10085-10091, 2010.

EC. 2000/13/CE: **Relativa à aproximação das legislações dos Estados Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios**. Parlamento Europeu e do Conselho, 20 de Março de 2000.

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.

EIGENMANN, P.A. **Mechanisms of food allergy**. *Pediatr Allergy Immunol*, vol. 20, p. 5-11, 2009.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. Laboratory of the Government Chemist, 1998.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. **Oral tolerance**. *Immunol Rev*, v.206, p. 232-259, 2005.

FDA. Department of Health and Human Services. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 Public Law 108-282**. Jul. 2006.

FDA. Department of Health and Human Services. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **A food labeling guide**. Jan. 2013.

FELLOWS, P. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FERREIRA, C. H. T.; SEIDMAN, E. **Alergia alimentar: atualização prática do ponto de vista gastroenterológico**. *Jornal de pediatria*. Rio de Janeiro. Vol. 83, n. 1 (jan./fev. 2007), p. 7-20, 2007.

FINKELMAN, F. D., M. E. et al. **Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models**. *J Allergy Clin Immunol*, v.115, n.3, p.449-457, 2005.

FIOCCHI A.; et al. **Heat treatment modifies the allergenicity of beef and bovine serum albumin**. *Allergy*, vol. 53, p. 798-802, 1998.

FIOCCHI, A.; et al. **World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines.** *Pediatr Allergy Immunol*, v. 21, p. 1-125, 2010.

FONSECA, L.F.L da.; SANTOS M.V da. **Conceitos básicos sobre composição do leite e métodos utilizados.** Curso online sobre qualidade do leite. São Paulo: Milkpoint, p. 11. 2000.

FUSELLI, F. et al. **Detection of fraudulent addition of bovine whey in water buffalo ricotta cheese by isoelectric focusing.** *J Sci Food Agric*, v. 95, p. 2757-2762, 2015.

GIRALDO-ZUÑIGA, A.D. **Tecnologias aplicadas ao processamento do soro de queijo.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 59, n. 340, p. 53-66, 2004.

GOETZ, J; KOEHLER, P. **Study of thermal denaturation of selected of whey and egg by low resolution of NMR.** *LWT - Food Sci Technol*, v38, p.501–512, 2005.

GONDIM, C. D. S. **Validação de métodos qualitativos: delineamento de procedimento e aplicação na pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru.** 2012. 155. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Belo Horizonte.

GONDIM, C.S; JUNQUEIRA, R.G; SOUZA, S.V.C. **Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos.** *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 70, n. 4, p. 433-447, 2011.

GONDIM, C.S.; et al. **An appropriate and systematized procedure for validating qualitative methods: Its application in the detection of**

**sulfonamide residues in raw milk.** *Analytica Chimica Acta*, v. 830, p. 11-22, 2014.

GOWIK, P. **The validation of methods for regulatory purposes in the control of residues.** *Journal of Chromatography A*, v. 1226, p. 8051-8058, 2009.

GONZÁLEZ, F.H.D.; DURR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.** Porto Alegre, 2001.

GREENE, L.S. **Asthma, oxidant stress, and diet.** *Nutrition*, v. 15, p. 899-907, 1999.

GRIMSHAW, K.E.C.; et al. **Diet and food allergy development during infancy: Birth cohort study findings using prospective food diary data.** *Allergy*, v. 133, n. 2, p. 511-519, 2014.

GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. **Fermentation of lactose to bio ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey.** *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 3, p. 375-384, 2010.

GUIMARÃES, T.C. et al. **Prevalence of Parent-Reported Food Allergy in Infants and Preschoolers in Brazil.** *Allergol Immunopathol.* v. 43, n. 4, p. 424-425, 2015.

GUPTA, R.S.; et al. **The Prevalence, Severity, and Distribution of Childhood Food Allergy in the United States.** *Pediatrics*, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2011.

HADDELAND, U.; et al. **Putative regulatory T cells are impaired in cord blood from neonates with hereditary allergy risk.** *Pediatr Allergy Immunol.* v. 16, p. 104-112, 2005.

HARAGUCHI, F.K. et al. **Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana.** Revista de Nutrição, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HAUG, A.; HØSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. **Bovine milk in human nutrition – A review.** Lipids in Health and Disease, v. 6, p. 25-25, 2007.

HELM, R.M.; BURKS, A.W. **Mechanisms of food allergy.** Current Opinion in Immunology, v. 12, p. 647–653, 2000.

HELM, R. M. et al. **A neonatal swine model for peanut allergy.** J Allergy Clin Immunol, v. 109, n. 1, p. 136-42, Jan, 2002.

HOCHWALLNER, H. et al. **Cow’s milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention.** Methods, v. 66, p. 22-33, 2014.

HUSBY, S. et al. Passage of dietary antigens into the blood of children with celiac disease: **Quantification and size distribution of absorbed antigens.** Gut, v. 28, p.1062-72, 1987.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Portaria INMETRO n. 157, de 19 de agosto de 2002. Aprova o regulamento técnico metrológico, estabelecendo a forma de expressar o conteúdo líquido a ser utilizado nos produtos pré-medidos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20 ago. 2002. Seção 1, p.41-42.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.** Duque de Caxias, RJ : INMETRO, 2010. 20 p.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos**

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

JACKSON, K.D.; HOWIE, L.D.; AKINBAMI, L. J. **Trends in Allergic Conditions Among Children: United States, 1997–2011.** NCHS Data Brief, n. 121, mai. 2013.

JOHANSSON, S.G.O et al. **Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003.** J Allergy Clin Immunol, v.113, n.5, 2004.

KAFRANI, A.T. et al. **Effects of Heating and Glycation of  $\beta$ -Lactoglobulin on Its Recognition by IgE of Sera from Cow Milk Allergy Patients.** J. Agric. Food Chem. v. 57, p. 4974–4982, 2009.

KATO, S.; et al. **Interlaboratory Study of Study of ELISA Kits for the Detection of Egg and Milk Protein in Processed Foods.** Journal of AOAC International, v. 98, n. 3, p. 810-816, 2015.

KERBACH, S. et al. **Managing food allergens in the food supply chain – viewed from different stakeholder perspectives.** Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, v. 1, n. 1, p. 50-60, 2009.

KHORIATY, E.; UMETSU, D. T. **Oral immunotherapy for food allergy: towards a new horizon.** Allergy, asthma & immunology research, v. 5, n. 1, p. 3-15, 2013.

KHUDA, S. et al. **Effect of processing on recovery and variability associated with immunochemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: sugar cookies.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 60, n. 17, p. 4195-4203, 2012.

KIM, J. S. et al. **Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children.** The Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 128, n. 1, p. 125-131.e2, 2011.

KLEBER, N. et al. **The antigenic response of b-lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation.** Eur. Food Res. Technol. v. 219, p. 105–110, 2004.

KODA, Y.K.L.; BARBIERI, D. **Alergia à Proteína do Leite de Vaca.** Pediat. v. 7 p. 62-66.

LACK, G. **Epidemiologic risks for food allergy.** The Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 121, n. 6, p. 1331-1336, 2008.

LEVY, R.B.; et al. **Consumo e comportamento alimentar entre adolescentes brasileiros: Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (PeNSE), 2009.** Ciência de Saúde Coletiva, v. 15, n. 2, p. 3085-3097, 2010.

LOPES, S.A. et al. **Elaboração e Análises Físico-Químicas de Biscoitos Amanteigados sem Glúten Adoçados com Açúcares Alternativos.** VII CONNEPI, 2012.

LORENZO, C.P. et al. **Development of an Optimized ELISA and a Sample Preparation Method for the Detection of  $\beta$ -Lactoglobulin Traces in Baby Foods.** J. Agric. Food Chem. v. 58, p. 1664-1671, 2010.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics,** (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0.

MANLEY, D. J.R. **Techonology of biscuits, crackers and cookies.** Cambridge: Woodhead, 1996. 476p.



MANLEY, D.J.R. **Biscuit, cracker and cookie recipes for the food industry.** Woodhead Publishing Limited, 2001.

MARTINO, D.J.; PRESCOTT, S.L. **Silent mysteries: epigenetic paradigms could hold the key to conquering the epidemic of allergy and immune disease.** *Allergy*; n. 65: p. 7–15, 2010.

MATSUDA, R.; et al. **Interlaboratory Evaluation of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for the Detection of Egg, Milk, Wheat, Buckwheat and Peanut in Foods.** *Journal of AOAC International*, v. 89, n. 6, p. 1600-1608, 2006.

MC GOWAN, E.C.; KEET, C.A.; **Prevalence of self-reported food allergy in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010.** *Allergy*, v. 132, n. 5, p. 1216-1219, 2013.

McBRIDE, D. et al. **The EuroPrevall birth cohort study on food allergy: baseline characteristics of 12,000 newborns and their families from nine European countries.** *Pediatr Allergy Immunol*, v. 23, p. 230–239, 2012.

MELO, V. H. S. **Detecção de avelã como potencial alergénio em chocolates por técnicas de biologia molecular.** Dissertação de mestrado. Instituto Politécnico de Bragança: Escola Superior Agrária, 88 p, 2011.

MONACI, L. et al. **Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review.** *Eur Food Res Technol*. v. 223, p. 149-179, 2006.

MONACI, L.; VISCONTI, A. **Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens.** *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n.5, p. 581-591, 2009.

MONACI, L.; VISCONTI, A. **Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives.** Trends in food science & technology, v. 21, n. 6, p. 272-283, 2010.

MONACI, L. et al. **Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA.** Food Chemistry, v. 127, n. 2, p. 669 - 675, 2011.

MORAES, K.S. et al. **Avaliação tecnológica de biscoitos tipo cookie com variações nos teores de lipídio e de açúcar.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, 233-242, 2010.

MORAIS M.B.; SPERIDIÃO, P.G.L.; SILLOS, M.D.; **Alergia à Proteína do Leite de Vaca.** Pediatria Moderna, v 49, n. 8, 2013.

MORIN, P. et al. **Microfiltration of buttermilk and washed cream buttermilk for concentration of milk fat globule membrane components.** Journal of Dairy Science, v. 90, n. 5, p. 2132-2140, 2007.

MOUÉCOUCOU, J. et al. **Polysaccharides reduce in vitro IgE/IgE-binding of  $\beta$ -lactoglobulin after hydrolysis.** Food Chem, v.104, p.1242-9, 2007.

MOWAT, A. M. **Basic mechanisms and clinical implications of oral tolerance.** Curr Opin Gastroenterol, vol 15, n.6, p. 546-556, 1999.

MUJUMDAR, A.S. **Handbook of Industrial Drying.** 4th Ed. CRC Press. 2014. 1348 p.

MURARO, A. et al. **EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Protecting consumers with food allergies: understanding food consumption, meeting regulations and identifying unmet needs.** Allergy, v. 69, p. 1464-1472, 2014.

NAKAMURA, A. et al. **Effect of Maillard Reaction on Allergenicity of Scallop Tropomyosin**. J. Agric. Food Chem. v. 53, p. 7559-7564, 2005.

NASPITZ, C.K. et al. **Sensibilização a alérgenos inalantes e alimentares em crianças brasileiras atópicas, pela determinação in vitro de IgE total e específica Projeto Alergia (PROAL)**. Jornal de Pediatria, v. 80, p. 203-210, 2004.

NEU, J.; RUSHING, J.; **Cesarean Versus Vaginal Delivery: Long-term Infant Outcomes and the Hygiene Hypothesis**. Clinics in perinatology, v. 38, n. 2, p. 321-331, 2011.

NWARU, B.I. et al. **The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta-analysis**. Allergy v. 69, p. 62-75, 2014.

ODIJK, J. et al. **Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966–2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations**. Allergy, v. 58, p. 833-843, 2003.

OKPALA, L.C.; OKOLI, E.C. **Optimization of composite flour biscuits by mixture response surface methodology**. Food Science and Technology International, v. 19, n. 4, p. 343-350, 2012.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: ESALQ, 2009. 451 p.

POMS, R.E.; KLEIN, C.L.; ANKLAM, E. **Methods for allergen analysis in food: a review**. Food Additives and Contaminants, v. 21, n. 1, p. 1-31, 2004.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F; RIVAS, J. **Cheese whey management: A review**. Journal of Environmental Management, v. 110, p. 48-68, 15 nov. 2012.

RIDLEY, E. **Detection of food allergens**. Food Science and Technology, v.29, n.1, p. 55-56, 2015.

RONA, R. J. et al. **The prevalence of food allergy: A meta-analysis**. Allergy, v. 120. n. 3, p. 638-646, 2007.

R-BIOPHARM. **RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (Art.No. R4902) Validation Report**. Alemanha, 2010.

R- BIOPHARM. **Procedimento analítico RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin**. Alemanha, 2011.

SAKAI, S.; et al. **Validation of Quantitative and Qualitative Methods for Detecting Allergenic Ingredients in Processed Foods in Japan**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 61, p. 5675-5680, 2013.

SAMPSON, H.A. **Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders**. Allergy, v. 103, n. 5, p. 717-728, 1999.

SANCHEZ, J.; SANCHEZ, A. **Epidemiology of food allergy in Latin America**. Allergologia et immunopathologia, v. 43, n. 2, p. 185-195, 2015.

SANTOS, A. A. O. et al. **Desenvolvimento de biscoitos de chocolate a partir da incorporação de fécula de mandioca e albedo de laranja**. Alim. Nutr, v. 21, n. 3, p. 469-480, 2010.

SANTOS, A.L.S dos. **Potencial antioxidante e adequação da rotulagem de bebidas de uva**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Nutrição). Departamento de Nutrição, Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.

SARINHO, E.S.C.; ALVES, J.G.B. **Alergia e Imunologia na Criança e no Adolescente**. Rio de Janeiro: Med Book, 2013. p271-381.

SEIBOLD, F. **Food-induced immune responses as origin of bowel disease?** Digestion, v. 71, p. 251-260, 2005.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades – degradações – modificações.** São Paulo: Varela; 1996. 517 p.

SHETH, S.S. et al. **Role of food labels in accidental exposure in food-allergic individuals in Canada.** Ann Allergy Asthma Immunol. v. 104, p. 60-65, 2010.

SICHERER, S. H. **Epidemiology of food allergy.** The Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 127, n. 3, p. 594-602, 2011. ISSN 0091-6749.

SILVA, J. de.P. **Efeito de uma dieta livre de proteínas no desenvolvimento de alergia alimentar e tolerância oral em camundongos BALB/c.** Dissertação. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

SIMONS E. et al. **Impact of ingredient labeling practices on food allergic consumers.** Ann Allergy Asthma Immunol, v.95, p.426-8, 2005.

SOLLER, L. et al. **Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada.** Allergy, v. 130, n. 4, 986-988, 2012.

SOUZA, C.C.T de.; ROSÁRIO, N.A. **Alergia às proteínas do leite de vaca - diagnóstico e tratamento.** Curitiba: Editora Moreira Jr. Disponível em: [http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id\\_materia=4947&fase=imprime](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=4947&fase=imprime).

Acesso em: 20/09/2016.

SOUZA, S.V.C. **Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos.**

2007. 297 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SMITH, D. W.; NAGLER-ANDERSON, C. **Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa.** J Immunol, vol. 174, n.7, p. 3851-3857, 2006

STANIĆ-VUČINIĆ, D.; ĆIRKOVIĆ-VELIČKOVIĆ, T. **The modifications of bovine  $\beta$ -lactoglobulin: Effects on its structural and functional properties.** Journal of the Serbian Chemical Society, v. 78, n. 3, p. 445-461, 2013.

STURM, F.; et al. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Beta-Lactoglobulin Determination: Interlaboratory Study.** Journal of AOAC International, v. 92, n. 5, p. 1519-1525, 2009.

TACO. **Tabela de Composição de Alimentos.** UNICAMP. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. **Trends in quality in analytical assurance.** Trends Anal. Chem, v.23, p. 535-552, 2004.

THOMPSON, M.; et al. **Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis.** IUPAC, Pure and Applied Chemistry, v. 74, p. 835-855, 2002.

TSUJI, N. M.; KOSAKA, E. A. **Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells.** Trends Immunol, vol. 29, n. 11, p. 532-540, 2008.

UE. União Europeia. **DIRECTIVA 2000/13/CE, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios.** Parlamento Europeu e do Conselho, 20 de Março de 2000.

VAZ, A. J. V. et al (Ed.). **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap. 8, p.67-83 ISBN 978-85-277-1334-4.

VERRILL, L.; BRUNS, R.; LUCCIOLI, S. **Prevalence of self-reported food allergy in U.S. adults: 2001, 2006, and 2010**. *Allergy and Asthma Proceedings*, v. 36, n. 6, p. 458-467, 2015.

VIEIRA, M. C. et al. **A survey on clinical presentation and nutritional status of infants with suspected cow milk allergy**. *BMC Pediatrics*, p. 10-25, 2010.

VIERK, K. et al. **Recalls of foods containing undeclared allergens reported to the US Food and Drug Administration, fiscal year 1999**. *J Allergy Clin. Immunol.* v. 109, n. 6, p. 1022-1026, 2002.

VUČINIĆ, D. S.; VELIČKOVIĆ, T. Č.; **The modifications of bovine  $\beta$ -lactoglobulin – effects on its structural and functional properties**. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 78, n. 3, p. 445-461, 2013.

YU, G.; DUCHÉN, K.; BJÖRKSTEÉN, B. **Fatty acid composition in colostrum and mature milk from non-atopic and atopic mothers during the first 6 months of lactation**. *Acta Paediatr*, v. 87, p. 729-36, 1998.

WAKABAYASHI, A. et al. **Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction**. *Immunology*, v. 119, n. 2, p. 167-177, 2006.

WAL, J. M. Bovine milk allergenicity. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 93, n. 5, p. S2-S11, 2004. ISSN 1081-1206.

WATANABE, H. et al. **Heat treatment of egg white controls allergic symptoms and induces oral tolerance to ovalbumin in a murine model of food allergy**. *Mol. Nutr. Food Res.* v. 58, p. 394-404, 2014.

WEGRZYN, A. N. et al. **Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy.** Allergy, v. 122, n. 2, p. 342-347, 2008.

ZEIGER, R. S. **Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children.** 111: 1662-1671 p. 2003.