

**PEDRO PAULO BORGES DOS SANTOS**

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E POTENCIAL ANTIGÊNICO DE PROTEÍNAS DO OVO NO PROCESSAMENTO DE BISCOITOS SEMIDOCES E VALIDAÇÃO DE MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO**

Belo Horizonte, MG

2017

**PEDRO PAULO BORGES DOS SANTOS**

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO E POTENCIAL ANTIGÊNICO DE PROTEÍNAS DO OVO NO PROCESSAMENTO DE BISCOITOS SEMIDOCES E VALIDAÇÃO DE MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO**

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  
Carvalho de Souza Ferreira

Belo Horizonte, MG

2017

# FICHA CATALOGRÁFICA

# FOLHA DE APROVAÇÃO

## **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 Dra. Cláudia Aparecida de Oliveira e Silva, pela colaboração, treinamento, e empréstimo de equipamento.

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*, o qual representa uma perspectiva para futuros direcionamentos do presente trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Biblioteca da FAFAR e Secretaria do PPGCA pela assistência nas pesquisas bibliográficas e resolução de questões administrativas.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Agradeço por ter sido meu guia e meu pilar durante toda essa jornada.

Aos meus pais José Frederico e Maria Madalena, meu irmão Miguel e à Letícia, pela compreensão, ajuda, força, confiança, incentivo e por me manterem motivado nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira, pela oportunidade, inspiração, amizade, dedicação e imensas contribuições durante esses longos anos.

À Cláudia Aparecida de Oliveira, por todo suporte, disponibilidade, amizade e por ter contribuído desde o início da execução deste trabalho.

À Ana Luiza Soares dos Santos, pela amizade, dedicação e pela forte parceria formada durante todo o trabalho.

À Ronália Leite Alvarenga, Marcos da Costa Lage e demais amigos do Laboratório de Bromatologia – Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos (BRO-UPAA), pelo ambiente agradável, amizade e ajuda.

Aos alunos de iniciação científica voluntários Eduardo Costa Soares e Gustavo Almeida Amaral, pela amizade, empenho e disposição.

À professora Silvana da Motta e demais funcionários do Laboratório de Tecnologia da FAFAR/UFMG, pelo empréstimo de equipamentos e disponibilidade.

À Dra. Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira e Profa Raquel Linhares Bello de Araújo, por terem aceitado o convite para participarem da banca.

Aos professores do PPGCA pela contribuição na minha formação e, principalmente, ao Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira, pelas contribuições.

Aos funcionários da FAFAR que fazem com que essa Faculdade funcione dia e noite.

## RESUMO

A alergia alimentar possui uma prevalência de aproximadamente 5 % em crianças e de 3 a 4 % em adolescentes e adultos. Os alimentos alergênicos podem causar efeitos adversos, mesmo em pequenas concentrações. Dentre eles, as proteínas do ovo se destacam pela prevalência elevada, sendo susceptíveis a alterações no processamento. Poucos métodos existentes para determinação de alergênicos em alimentos cumprem com os parâmetros de desempenho necessários para validação. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar a degradação de proteínas da clara do ovo em biscoitos semidoces, submetidos a diferentes condições de processamento, e validar um kit imunoenzimático para o referido escopo analítico. Foram preparadas formulações com 0,022 % de ovo as quais foram assadas por diferentes tempos (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) e temperaturas (150; 180 e 210 °C), em um delineamento fatorial, as quais foram analisadas pelo kit. Na validação intralaboratorial, foram analisados, em duas baterias analíticas distintas, biscoitos semidoces incorporados de padrão de ovoalbumina, em nove níveis de concentração (0,125; 0,185; 0,25; 0,5; 1,0; 3,0; 4,5; 9 e 13,5 mg/kg) e 10 replicatas, mais o branco. Foi observada redução significativa ( $p < 0,05$ ) do teor de proteínas da clara nos biscoitos assados. Com 25 minutos de assamento, foram evidenciadas quedas de 83,1; 92,6 e 100 % para as temperaturas 150, 180 e 210 °C, respectivamente, indicando influência do processamento no potencial antigênico. Na análise dos resultados da validação, sob uma abordagem quantitativa, percebeu-se que os critérios de desempenho não foram atendidos. Pela abordagem qualitativa, foi encontrado 100 % de taxa de seletividade e confiabilidade para as amostras brancas. Nos níveis 0,125; 0,185 e 0,25 mg/kg, as taxas de sensibilidade e confiabilidade encontradas foram de 0; 90 e 80 %, respectivamente. A partir da concentração 0,5 mg/kg, os valores estimados para essas taxas foram de 100 %, demonstrando sensibilidade do método. A acordância variou de 0,5 a 1,0 e a concordância de 0,7 a 1,0. Nas concentrações 0; 0,125 e acima de 0,5 mg/kg, a concordância atingiu valores máximos, o que mostrou padronização adequada do método. O limite de detecção estabelecido foi de 0,2 mg/kg. O kit estudado apresentou, ainda, seletividade em relação à outra proteína alergênica, a betalactoglobulina. Desta forma, as condições de assamento foram evidenciadas como determinantes da antigenicidade das proteínas da clara e o kit estudado foi considerado apropriado para a detecção de proteínas da clara em biscoitos, caracterizando-se uma importante ferramenta para o controle da rotulagem alérgenos em alimentos. **Palavras-chave:** alergia alimentar, proteínas do ovo, degradação de proteínas, ELISA, validação de métodos

## ABSTRACT

The prevalence of food allergy is about 5 % in children and 3 % to 4 % in teenagers and adults. The food allergens can cause adverse effects even in small amounts. Among them, egg proteins are highlighted by high prevalence, being susceptible to changes in processing. Few existing methods for food allergen determination comply with the performance parameters required for validation. Therefore, the aims of this work was study the degradation of egg white proteins in semi-sweet biscuits, under different processing conditions, and validate an immunoenzymatic kit for this scope. Formulations containing 0,022 % of egg were baked in different times (5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes) and temperatures (150, 180 and 210 °C), in a factorial design, and were analyzed by the kit. In the single-laboratory validation, two different analytical batches of semi-sweet biscuits spiked with ovalbumin standard in nine concentration levels (0.125, 0.185, 0.25, 0.5, 1.0, 3.0, 4.5, 9 and 13.5 mg/kg) in 10 replicates, plus the blank, were analyzed. A significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the egg protein content was observed in baked biscuits. With 25 minutes of baking, were evidenced reductions of 83.1; 92.6 and 100% for the temperatures 150, 180 and 210 °C, respectively, indicating influence of the processing on the antigenic potential. The results of the quantitative approach of validation showed that the performance criteria were not complied. In the qualitative approach, 100 % of sensitivity and reliability rates were found for the blank samples. In the levels 0.125; 0.185 and 0.25 mg/kg the sensitivity and reliability rates were 0; 90 and 80 %, respectively. From the level 0.5 mg/kg, the estimated values of these rates were 100 %, demonstrating sensitivity of the method. The accordance ranged from 0.5 to 1.0 and concordance from 0.7 to 1.0. For the concentrations of 0; 0.125 and over 0.5 mg/kg the concordance reaches maximum values, showing standardization of the method. The detection limit was established as 0.2 mg/kg. The studied kit presented selectivity in the presence of the other allergenic protein beta-lactoglobulin. Thus, the baking conditions were evidenced as critical for the antigenicity of egg white proteins and the studied kit was considered appropriate for the detection of egg white proteins in semi-sweet biscuits, characterizing an important tool for the implementation of the control of food allergens labeling.

**Keywords:** food allergy, egg proteins, protein degradation, ELISA, method validation



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura tridimensional da ovotransferrina .....	36
<b>Figura 2.</b> Estrutura tridimensional da lisozima .....	36
<b>Figura 3.</b> Estrutura tridimensional da ovomucoide.....	37
<b>Figura 4.</b> Estrutura tridimensional da ovoalbumina.....	38
<b>Figura 5.</b> Fluxograma do processo de produção de biscoitos semidoces .....	70
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática de delineamento experimental para avaliação da degradação da proteína do ovo em biscoito semidoce, sob diferentes condições de assamento.....	73
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática de delineamento experimental da validação do kit RIDASCREEN®FAST Ei/Egg Protein (Art. No. R6402).....	75
<b>Figura 8.</b> Decaimento no teor de proteínas da clara e seus respectivos percentuais sob diferentes condições de temperatura e tempo de assamento .....	79
<b>Figura 9.</b> Perfil de decaimento do teor de proteínas da clara em função das condições de assamento estudadas com deineamento fatorial completo 6 x 3 .....	81
<b>Figura 10.</b> Gráfico de probabilidade da normal (Q-Q Plot) para os resultados obtidos no estudo de degradação de proteínas da clara do ovo em biscoitos semidoces.....	82
<b>Figura 11.</b> Porcentagens de recuperação individuais (R), recuperação média (Rm), desvio padrão (s) obtidos nos estudos de veracidade e precisão do kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®) para determinação de ovoalbumina em biscoito semidoce.....	86
<b>Figura 12.</b> Perfil de resultados de acordância (ACO) e concordância (CON) como indicadores da precisão do kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®) para determinação de ovoalbumina em biscoito semidoce. ....	93

**Figura 13.** Curva de desempenho construída por meio do modelo não linear logito para o kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®) para determinação de ovoalbumina em biscoito semidoce.....94

**Figura 14.** Taxas de sensibilidade, seletividade e confiabilidade obtidas para amostras brancas e adicionadas de ovoalbumina, na presença de betalactoglobulina como potencial interferente, em estudo de seletividade do kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®) para determinação de ovoalbumina em biscoito semidoce. .95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição nutricional do ovo inteiro e fresco.....	25
<b>Tabela 2.</b> Formulação dos biscoitos semidoces .....	68
<b>Tabela 3.</b> Níveis de concentração de ovoalbumina avaliados no estudo de validação .....	75
<b>Tabela 4.</b> Quadro ANOVA para o estudo fatorial 6 x 3 .....	80
<b>Tabela 5.</b> Número de observações, médias de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, obtidos nos estudos de veracidade e precisão do kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®) para determinação de ovoalbumina em biscoito semidoce.....	86
<b>Tabela 6.</b> Taxas de falso-negativos, de sensibilidade, de falso-positivos, de seletividade e de confiabilidade estimadas na detecção de ovoalbumina em biscoito semidoce pelo kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®).....	91
<b>Tabela 7.</b> Acordância e concordância estimadas na detecção de ovoalbumina em biscoito semidoce pelo kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®).....	92

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ACO	Acordância
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BLG	Betalactoglobulina
BRO-UPAA	Laboratório de Bromatologia – Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação
CON	Concordância
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPR <sub>r</sub>	Desvios padrão relativos sob condições de repetibilidade
DPR <sub>R</sub>	Desvios padrão relativos sob condições de precisão intermediária
EAST	Teste enzimático-alergossorvente
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent</i>
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FALCPA	Ato de Proteção ao Consumidor e Rotulagem de Alimentos Alergênicos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4

INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IOM	Instituto Octávio Magalhães
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de detecção
LIB	Laboratório de Imunobiologia
LQ	Limite de Quantificação
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Espectrometria de massas
OLASA	Levantamento Online Latino-Americano de Anafilaxia
OVA	Ovoalbumina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPGCA	Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos
R	Recuperação individual
RAST	Teste radioalergossorvente
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIE	<i>Rocket</i> Imunoeletroforese
Rm	Recuperação média
RPC	Região de perda de confiabilidade
$R_{RJ}$	Coeficiente de correlação de <i>Ryan-Joiner</i>
s	Desvio padrão
SDS-PAGE	Eletroforese com dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida
slgA	Imunoglobulina A secretória
TCF	Taxa de confiabilidade
TFN	Taxa de falsos negativos
TFP	Taxas de falsos positivos
TSB	Taxa de sensibilidade
TST	Taxa de seletividade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1 Objetivo Geral .....	20
2.2 Objetivos Específicos .....	20
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
3.1 Ovo.....	21
3.1.1 Aspectos econômicos .....	21
3.1.2 Definições e aspectos nutricionais .....	23
3.2 Alergia Alimentar .....	27
3.2.1 Epidemiologia.....	32
3.2.2 Alergia a proteínas do ovo .....	34
3.2.2.1 Estudos de degradação das proteínas do ovo.....	39
3.3 Métodos para análise de alergênicos.....	41
3.3.1 ELISA .....	45
3.4 Rotulagem de alimentos alergênicos .....	47
3.4.1 Rotulagem de alimentos alergênicos no Brasil .....	49
3.5 Biscoitos.....	51
3.5.1 Definições, produção e consumo .....	51
3.5.2 Classificação .....	52
3.5.2.1 Massa dura .....	52

3.5.2.2	Massa curta .....	53
3.5.2.3	Biscoitos semidoces .....	54
3.6	Validação de métodos.....	55
3.6.1	Validação intralaboratorial.....	56
3.6.2	Parâmetros de desempenho de métodos quantitativos .....	58
3.6.2.1	Seletividade .....	58
3.6.2.2	Limites e incerteza .....	58
3.6.2.3	Faixa de trabalho e faixa linear .....	60
3.6.2.4	Precisão, veracidade e recuperação.....	60
3.6.2.5	Robustez.....	62
3.6.3	Parâmetros de desempenho de métodos qualitativos.....	62
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
4.1	Equipamentos .....	65
4.2	Materiais.....	66
4.3	Padrões, Reagentes e Insumos .....	67
4.4	Parte experimental .....	67
4.4.1	Formulação de biscoitos .....	68
4.4.2	Determinação de proteínas do ovo em biscoito por ELISA .....	70
4.5	Estudo de degradação de proteínas da clara do ovo em biscoitos semi doces .....	72
4.5.1	Delineamento experimental.....	72
4.5.2	Análise estatística .....	73

4.6	Validação .....	74
4.6.1	Delineamento experimental.....	74
4.6.2	Reagentes, padrões e soluções.....	76
4.6.2.1	Solução estoque (1 mg/mL).....	76
4.6.2.2	Solução intermediária (10 µg/mL).....	76
4.6.3	Análise estatística .....	76
4.6.3.1	Abordagem quantitativa .....	76
4.6.3.2	Abordagem qualitativa .....	77
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
5.1	Estudo de degradação de proteínas da clara do ovo em biscoitos semi doces.....	78
5.2	Validação .....	85
5.2.1	Abordagem quantitativa .....	85
5.2.2	Abordagem qualitativa.....	90
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O ovo de galinha é um alimento bastante popular e presente em diversas preparações culinárias, constituindo-se como um dos principais alimentos de origem animal da alimentação humana, desde a antiguidade, sendo fonte de diversos nutrientes e contribuindo para o equilíbrio nutricional da dieta (APPLEGATE 2000; SURAI E SPARKS, 2001). O Brasil é um importante produtor desse alimento, liderando a produção no continente sulamericano e ocupando a sétima posição no *ranking* mundial, a qual tem China, Estados Unidos (EUA) e Índia como os maiores produtores (FAO, 2015).

A alergia alimentar é um problema emergente de saúde pública, cuja prevalência vem aumentando, o que caracteriza tal efeito adverso à saúde como um importante desafio para a indústria alimentícia e para órgãos regulamentadores (BESLER, 2001).

As mudanças na disponibilização de nutrientes e nos hábitos alimentares, oriundas de inovações tecnológicas, têm impactado o cotidiano de indivíduos portadores de alergia alimentar (MARTINS E GALEAZZI, 1996). Mesmo com a exclusão de um determinado alimento alergênico da dieta, pode haver exposição acidental, desencadeando manifestações alérgicas (SAMPSON, 1998; DA SILVA PEREIRA, MOURA & CONSTANT, 2008).

Ainda, indivíduos alérgicos podem ser expostos a alimentos que supostamente estariam livres de alergênicos, devido às contaminações durante as diferentes etapas da cadeia produtiva, incluindo produção, transporte e estocagem (POMS, et al., 2004).

Dentre os alimentos causadores de alergia alimentar, o ovo é o que possui uma das maiores prevalências e, para indivíduos alérgicos, a presença de ovo como ingrediente ou contaminante nos alimentos processados pode desencadear diversos danos à saúde ou consequências mais severas como a reação anafilática (LI *et al.*, 2008; AZARNIA *et al.*, 2013). Estima-se que a prevalência de alergia ao ovo na população mundial varie entre 1,6 a 3,2 %, (MINE & YANG, 2008; AZARNIA *et al.*, 2013). Além de existirem muitos alimentos que contêm ovo de galinha como ingrediente, algumas proteínas do

ovo podem aparecer como componentes em diversos alimentos ou até mesmo em medicamentos (MARTORELL ARAGONÉS *et al.*, 2001).

O processamento de alimentos, como o tratamento térmico, é capaz de alterar o potencial alergênico de algumas proteínas. A alergenicidade pode aumentar, diminuir ou permanecer inalterada após algumas etapas do processamento. Além disso, os ingredientes alergênicos podem sofrer alterações ao entrarem em contato com outros constituintes presentes no alimento (BUGYI *et al.*, 2010; KHUDA *et al.*, 2012; GOMAA E BOYE, 2013; SHIN *et al.*, 2013; TOROK *et al.*, 2014).

Dentre as matrizes alimentares para serem monitoradas quanto à presença de alergênicos, os biscoitos têm uma relevância considerável, pois, no cenário mundial, o Brasil é um dos maiores produtores desse produto, e detentor do segundo maior mercado consumidor. Além disso, é um alimento acessível e consumido por diversas faixas etárias (ABIMAPI, 2015). Os biscoitos semidoces são os que estão presentes no mercado mundial em maior quantidade, apresentam uma grande diversidade e podem ser utilizados em processamentos secundários (MANLEY, 2001; ABIMAPI, 2015).

Com a preocupação de informar aos consumidores sobre a presença dos principais alimentos que causam alergias alimentares, nos rótulos de alimentos embalados, as autoridades brasileiras aprovaram, recentemente, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 26/2015 que dispõe sobre os requisitos para a rotulagem desses alimentos (BRASIL, 2015).

Para o cumprimento da rotulagem de alimentos alergênicos, visando à proteção de possíveis consumidores alérgicos, é necessário que existam métodos confiáveis. Contudo, essa detecção torna-se difícil pelo fato dos compostos alérgenos estarem presentes, geralmente, em quantidades traços ou serem mascarados pela matriz alimentar. Existem poucos dados estabelecendo os limites de segurança (*threshold*), relacionados às menores doses capazes de desencadear efeitos atribuídos à alergia alimentar, portanto, a sensibilidade dos métodos deve ser discutida (POMS *et al.* 2004).

Diversos métodos são reportados na literatura para o propósito de detecção e quantificação de alergênicos alimentares. Porém, poucos deles cumprem com todos os requisitos de desempenho necessários, incluindo seletividade, sensibilidade, precisão, veracidade e limites de detecção e

quantificação para métodos quantitativos e, taxas de seletividade, sensibilidade, falsos resultados, acordância, concordância, região de perda de confiabilidade e limite de detecção para métodos qualitativos. Os métodos também devem ser práticos, ter bom custo-benefício e trabalhar com ampla faixa de confiabilidade em diferentes alimentos processados, com variadas composições (KERBACH *et al.*, 2009; TÖRÖK *et al.*, 2015).

A maioria dos métodos existentes para a análise de alergênicos em alimentos tende a ser demorada e trabalhosa, além de demandar equipamentos caros e mão de obra treinada. Desta forma, há uma tendência no desenvolvimento de métodos de análise que possam ser aplicados de forma mais simples, segura e miniaturizada, que possibilitem aos órgãos reguladores, como também aos consumidores, o monitoramento dos alimentos quanto à presença de alergênicos, quer seja de forma acidental ou intencional; além de permitirem aos fabricantes o monitoramento de seus produtos no próprio local de produção, a fim de controlar a contaminação cruzada (SCHUBERT-ULRICH *et al.*, 2009).

Kits de *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) são disponíveis comercialmente para uma grande variedade de alergênicos alimentares, com variados limites de detecção, representando uma alternativa analítica simples e prática (SCHUBERT-ULRICH *et al.*, 2009). Porém, podem surgir limitações no desempenho analítico dessa técnica, principalmente ao trabalhar com alimentos processados, de forma que as possíveis fontes de erro devem ser investigadas (TÖRÖK *et al.*, 2015).

Nesse contexto, devido à importância da alergia às proteínas do ovo no cenário mundial e ao fato dos biscoitos serem uma importante matriz alimentar para o monitoramento de alergênicos, destaca-se a necessidade de avaliar a degradação e antigenicidade dessas proteínas sob diferentes condições de processamento, assim como de validar um método de ELISA para este escopo analítico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar o perfil de degradação das proteínas do ovo no processamento de biscoitos semidoces, avaliando sua capacidade antigênica *in vitro* por ELISA, e validar um kit comercial para determinação destas proteínas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Formular biscoitos semidoces sem ovo e com ovo, simulando contaminação, e submetê-los a diferentes tratamentos, num experimento fatorial envolvendo os fatores tempo e temperatura de assamento.
- Avaliar o perfil de degradação das proteínas do ovo e o impacto do processamento no potencial antigênico por meio da análise de ELISA.
- Validar um kit comercial para a determinação de proteínas do ovo em biscoitos semidoces por ELISA, empregando abordagens quantitativa e qualitativa na análise dos resultados.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Ovo

##### 3.1.1 Aspectos econômicos

O ovo é um alimento bastante consumido no mundo e seu consumo vem crescendo a cada ano. Estima-se que a produção deste alimento em 2013 foi de aproximadamente 68 milhões de toneladas. O continente onde há a maior produção de ovos no cenário mundial é a Ásia, sendo a China o país maior produtor, com cerca de 24 milhões de toneladas, em 2013, seguido pelos Estados Unidos da América e Índia (FAO, 2016).

O Brasil possui uma elevada produção de ovos, ocupando a sétima posição no *ranking* mundial e configurando-se como o principal produtor da América do Sul, seguido pela Colômbia e Argentina. Segundo dados mais recentes publicados pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a produção brasileira de ovos, em 2014, foi de aproximadamente 2,17 milhões de toneladas, valor superior ao observado em 2009, que foi aproximadamente 1,92 milhões de toneladas. Esse crescimento na produção também foi observado nos outros países do continente (FAO, 2016).

No segundo trimestre de 2016, a produção de ovos de galinha no Brasil foi de 757,51 milhões de dúzias, uma marca nunca antes atingida. O Estado de São Paulo é o principal produtor no país e detém 29,6% da produção nacional, sendo também o Estado com maior aumento na produção. Minas Gerais e Paraná também figuram como importantes produtores de ovos no país (IBGE, 2016).

O consumo de ovos per capita no país, em 2015, foi estimado em 191 unidades. Apesar da maior parte dos ovos produzidos no Brasil ser destinado ao consumo interno, a exportação desse alimento possui um número considerável. Em 2015, o total de exportações foi de aproximadamente 18,7 mil toneladas, correspondendo a uma receita de aproximadamente 24 milhões de dólares. Do total de ovos exportados, em 2015, 92% foram na forma *in natura*. Os principais destinos foram a África e a Ásia e os maiores importadores Angola e Emirados Árabes Unidos (ABPA, 2016).

Com o processo de urbanização e industrialização ocorrido no Brasil na década de 50, houve a necessidade de profissionalizar e aumentar a eficiência da criação de galinhas no país. Nesse período, ocorreram a inclusão de matrizes americanas, instalação de granjas subsidiárias de grandes empresas estrangeiras e a visitas de diversos técnicos estrangeiros para estimular e orientar os avicultores nacionais. Conseqüentemente, houve modernização e adequação do setor não somente em relação às novas tecnologias, mas também em aspectos relacionados à produção industrial, ao comércio, à política e ao mercado (UBABEF, 2011).

Neste contexto, o sistema de integração entre indústria e produtor inseriu a moderna avicultura na economia capitalista, possibilitando às agroindústrias a obtenção de matéria-prima de qualidade e em tempo adequado ao ritmo do processo produtivo, além de adaptação às instabilidades do mercado. Já para os produtores, essa forma de integração facilitou o escoamento do produto, a produção contínua e resultou em maior facilidade e rapidez no acesso a créditos e inovações tecnológicas. Portanto, o sistema de integração foi um divisor de águas na avicultura nacional. A forma de criação de aves em confinamento trouxe vantagens econômicas, redução da mão de obra, diminuição de desperdícios e gastos com ração, maior controle sanitário, sobre a produção, manejo e sanidade das aves, a distribuição de alimento e aplicação de vacinas e medicamentos (UBABEF, 2011).

A produção de ovos no Brasil é feita tanto para o consumo *in natura* quanto na forma processada. A produção é caracterizada pela predominância do sistema de criação em gaiolas, com granjas de cria e recria, separadas das granjas de produção, sendo que a maior parte é realizada por produtores independentes de pequeno e médio porte, que são responsáveis pela preparação da própria ração na propriedade e que trabalham nos tradicionais galpões abertos. Há também a presença dos grandes produtores que buscam recursos como a adequação climática e automação das instalações (DONATO *et al.*, 2009)

Na produção de ovos, são considerados alguns fatores como: construção de aviários, conforme os padrões recomendados; equipe administrativa e técnica experiente e motivada para produção; mercado bem definido para comercialização dos ovos que são produzidos; facilidade de

acesso ao crédito bancário ou disponibilidade de recursos financeiros; verificação da sanidade e manejo constante nos aviários; antecipação nas vendas de ovos frescos, para aumentar a credibilidade perante o consumidor; classificação e higiene rigorosa no momento da embalagem; instalações de aviários em terreno de fácil acesso e em locais onde busca evitar o *stress* nas aves (SOBRINHO & FONSECA, 2007).

A seleção de aves para criação e produção de ovos deve ser criteriosa. O produtor precisa escolher o tipo de ave que vai trabalhar levando em conta à preferência do mercado consumidor. É necessário que a ave tenha baixa mortalidade, resistência a doenças, baixa relação entre consumo de ração e postura de ovos, e capacidade para postura acima de 240 ovos/ano com boa pigmentação da gema (SOBRINHO & FONSECA, 2007).

### 3.1.2 Definições e aspectos nutricionais

Segundo o Padrão de Identidade e Qualidade entende-se por "Ovo integral" o produto de ovo homogeneizado que contém as mesmas proporções de clara e gema de um ovo em natureza (BRASIL, 1991). Pela simples designação ovos, entendem-se os ovos de galinha em casca, sendo os demais acompanhados de designação da espécie que procedem (BRASIL, 1990). Os humanos utilizam ovos de vários animais, como pombos, perus, aves selvagens, pinguins e alguns répteis. No entanto, sem dúvida, o ovo de galinha é o mais comumente utilizado e consumido no mundo (MCGEE, 2007).

O ovo contém nutrientes essenciais para nutrir o gérmen da espécie. Ele é formado no ovário, ou oviduto, e é composto por protoplasma, vesículas germinativas e envoltórios. As principais partes deste alimento são: a gema (que representa 30 % do peso total do ovo), a clara (60 % do peso), a casca (10 % do peso) e a membrana da casca (peso desprezível) (SOUZA-SOARES & SIEWERDT, 2005).

A gema do ovo consiste em uma dispersão de fosfoproteínas e lipoproteínas e possui função quase exclusivamente nutritiva, possuindo cerca de três quartos das calorias e maior parte do ferro, tiamina e vitamina A presente no ovo. A sua coloração é devida a presença de carotenóides. A clara é composta, na sua maior parte, por água, sendo também composta por

proteínas (ovoalbumina, ovotransferrina, ovomucóide, globulinas lisozima, ovomucina e avidina) e traços de minerais (MCGEE, 2007). A casca é composta por substâncias orgânicas (escleroproteína e colágeno) e minerais (carbonato de cálcio e magnésio) (SOUZA-SOARES & SIEWERDT, 2005).

O ovo de galinha é um alimento bastante popular, e devido à sua facilidade de produção, valor nutricional e os diversos usos na culinária, ele é amplamente utilizado na alimentação humana desde a antiguidade, sendo servido em diversas variedades e constituindo-se como um dos principais alimentos de origem animal (SURAI & SPARKS, 2001).

Uma rica variedade de nutrientes está presente no ovo, tornando este alimento um importante contribuinte para o equilíbrio nutricional da dieta (APPLEGATE, 2000). O ovo é uma fonte equilibrada de aminoácidos essenciais, contém ácido linoleico, um ácido graxo insaturado essencial na alimentação humana, além de possuir diversos minerais, vitaminas e pigmentos com função antioxidante (MCGEE, 2007). Além disso, o ovo é uma fonte barata de proteínas com alto valor biológico, importante componente na dieta de idosos, famílias de baixa renda, crianças na fase de crescimento e pessoas com dietas hipocalóricas (APPLEGATE, 2000).

A composição do ovo de galinha é influenciada por diversos fatores, como dieta, tamanho e fase do desenvolvimento do animal (MCGEE, 2007). Na **Tabela 1** encontra-se apresentada a composição do ovo cru inteiro e fresco.



**Tabela 1.** Composição nutricional do ovo inteiro e fresco

<b>Componente (unidade)</b>	<b>Teor (/100g)</b>
Valor energético (kcal)	143
Proteínas (g)	12,56
Carboidratos (g)	0,72
Gorduras totais (g)	9,51
Gorduras poli-insaturadas (g)	1,91
Gorduras monoinsaturadas (g)	3,66
Gorduras saturadas (g)	3,13
Gorduras trans (g)	0,04
Colesterol (mg)	372
Cálcio (mg)	56
Ferro (mg)	1,75
Magnésio (mg)	12
Fósforo (mg)	198
Potássio (mg)	138
Sódio (mg)	142
Zinco (mg)	1,29
Tiamina (mg)	0,04
Riboflavina (mg)	0,46
Vitamina B-12 (µg)	0,89
Vitamina B-6 (mg)	0,17
Vitamina A (UI)	540
Vitamina E (mg)	1,05
Vitamina D (UI)	82

Fonte: USDA, 2015.

As proteínas do ovo estão distribuídas na clara e na gema e possuem propriedades que contribuem para sua proteção, para alimentação humana e uso industrial. A ovoalbumina (OVA) é a que está presente na clara em maior quantidade, ela é vital para a gelificação, propriedades espumantes e emulsionantes da clara e por inibir proteínas digestivas. A ovomucina pode contribuir para a estrutura de gel espesso da clara na forma de fibras flexíveis, além de impedir a invasão por patógenos. A ovotransferrina é uma proteína sensível ao calor e que possui capacidade ligante ao Ferro. A ovomucóide, por sua vez, é conhecida por ser resistente ao calor e enzimas digestivas. Enquanto a lisozima possui atividade antimicrobiana, pela sua capacidade de agir na parede celular de bactérias. Na gema, estão presentes proteínas com

papel nutritivo, antimicrobiano e funções antioxidantes (IANNOTTI, 2014; YU, 2014).

O ovo pode ser considerado um alimento funcional, sendo que estudos recentes citam benefícios para a saúde decorrentes do consumo deste alimento. Os ovos podem fornecer quantidades significativas e biodisponíveis dos carotenoides luteína e zeaxantina, que são compostos com função antioxidantes, os quais podem prevenir processos degenerativos na visão de idosos e diminuir o risco de catarata (APPLEGATE, 2000).

Estudos constataram que dieta com alimentos ricos em vitamina A, como o ovo, podem ser um fator protetor contra desencadeamento de xeroftalmia, doença que atinge os olhos causando dificuldade de enxergar, principalmente à noite, que está relacionada à deficiência de vitamina A (TARWOTJO *et al.*, 1982; GITTELSOHN *et al.*, 1997).

Devido ao fato de o ovo ser uma fonte de colesterol, muitas vezes é recomendando que seu consumo seja limitado, com o objetivo de reduzir os níveis de colesterol e prevenir doenças cardiovasculares. Entretanto, muitos estudos não encontraram relação entre o consumo de ovos e a incidência de doenças cardiovasculares, como relacionado a seguir.

Hu *et al* (1999) realizou um estudo prospectivo para avaliar o consumo de ovos e o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular em homens e mulheres adultas. Foi encontrado que o consumo regular de ovo não aumentou o risco de acidente vascular cerebral e de doenças cardiovasculares. Nakamura *et al* (2006), em um estudo prospectivo, realizado no Japão, não encontrou associação significativa entre o consumo de ovos e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Qureshi *et al.* (2006), em um estudo de coorte, não encontrou diferenças significativas entre um grupo de pessoas que consumiam mais de seis ovos por semana quando comparado a outro grupo que não consumia ou no qual o consumo era inferior a um ovo por semana, no que diz respeito a casos de acidente vascular cerebral, acidente vascular cerebral isquêmico ou doença da artéria coronária, com exceção no subgrupo de diabéticos, onde essa tendência não foi observada. Mutungi *et al.* (2008) avaliaram indivíduos obesos submetidos a uma dieta com baixa oferta de carboidrato e consumo de três ovos por dia. Foi observado aumento nos níveis de HDL e diminuição de fatores de risco associados à síndrome

metabólica. Também, em uma meta-análise não foi evidenciada associação entre o consumo de ovo e o risco de doença cardiovascular e acidente vascular cerebral (RONG *et al.*, 2015).

O ovo é utilizado na indústria de alimentos de diversas formas, devido ao seu valor nutritivo e propriedades tecnológicas. Há a utilização da gema e da clara ou de suas proteínas nas indústrias, devido às suas propriedades sensoriais e funcionais. A clara, graças à capacidade de formar espumas, é utilizada na fabricação de produtos de baixa densidade e elevada expansibilidade. As proteínas da gema possuem propriedades emulsificantes e são utilizadas na manufatura de produtos onde é necessário essa propriedade, como a maionese (MCGEE, 2007).

### **3.2 Alergia Alimentar**

Alergia alimentar é considerada um problema emergente de saúde pública, principalmente em países desenvolvidos. Nas últimas décadas a prevalência desse tipo de alergia tem aumentado, tornando-se um grande desafio para a indústria alimentícia e para órgãos regulamentadores (BESLER, 2001; SICHERER & SAMPSON, 2014). Devido às inovações tecnológicas que têm trazido rápidas mudanças nos hábitos alimentares e na disponibilidade de alimentos e nutrientes, a importância do monitoramento de alérgenos em matéria-primas e alimentos tem sido crescente (MARTINS & GALEAZZI, 1996).

Qualquer reação anormal à ingestão de alimentos ou aditivos presentes em sua composição, são consideradas reações adversas aos alimentos. Estas são classificadas em tóxicas e não tóxicas, sendo que as tóxicas são dependentes da substância ingerida ou das propriedades farmacológicas de algumas substâncias presentes em alimentos, enquanto as não tóxicas dependem da susceptibilidade individual e são classificadas em não imuno-mediadas (intolerância alimentar) ou imuno-mediadas (alergia alimentar ou hipersensibilidade alimentar) (SOLÉ *et al.*, 2002; SAMPSON, 2004). Nas reações alérgicas estão envolvidos mecanismos imunológicos que podem ser ou não mediados pela Imunoglobulina E (IgE), a qual, geralmente, está associada a alergias alimentares e reações de hipersensibilidade, caracterizadas pela rápida liberação de mediadores como a histamina. Já o

termo intolerância alimentar se refere a qualquer reação adversa a alimentos ou aditivos, sem o envolvimento de mecanismos imunes (SOLE *et al.*, 2002).

O tipo de resposta imune desencadeado pelas alergias alimentares as divide em duas categorias: as reações de hipersensibilidade imediata, e as de hipersensibilidade retardada. Na hipersensibilidade imediata ocorre uma resposta adversa mediada pela IgE para um determinado alergênico, as reações recebem esse nome devido ao aparecimento dos sintomas em poucos minutos até algumas horas após o contato com o alergênico. As reações de hipersensibilidade retardada são mediadas pelas células T do sistema imunológico e os sintomas surgem entre 24 a 48 horas após o contato com o alimento alergênico (COSTA *et al.*, 2012)

Os antígenos são substâncias estranhas ao corpo (proteínas, polipeptídeos, ácidos nucleicos), com estruturas complexas que podem conter um ou mais sítios antigênicos. Os anticorpos são proteínas produzidas no corpo em resposta aos antígenos com a finalidade de inativá-los (ABBAS *et al.*, 2008).

As células predominantes nas reações alérgicas são os mastócitos e os basófilos. Quando ocorre um processo alérgico, há a migração de basófilos para os tecidos afetados, que produzem citocinas Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 3 (IL-3), que estimulam a síntese de IgE e atopia. O eosinófilo é célula efetora citotóxica, importante na patogenia das doenças alérgicas e, que tem o poder de destruir parasitas e tecidos. Sua ação é estimulada por mediadores lipídicos e citocinas liberadas por outras células (LOPES *et al.*, 2006).

A Imunoglobulina A (IgA) pode ser encontrada em secreções e tem a função de proteger a invasão dos sistemas respiratório e digestivo. Devido à sua presença no trato gastrointestinal, desempenha um importante papel na redução da penetração de antígenos na mucosa. A Imunoglobulina M (IgM) é formada quando um novo agressor ataca o organismo, ela atua de forma temporária. A Imunoglobulina G (IgG) tem ação após a IgM, com a finalidade de formar uma memória duradoura. A IgE é o anticorpo que está presente nas reações alérgicas e anafiláticas e protege o corpo contra parasitas intestinais (ABBAS *et al.*, 2008; DA SILVA PEREIRA *et al.*, 2008).

Os linfócitos ou células B são células linfoides que dão origem aos plasmócitos, os quais são responsáveis pela produção de anticorpos. Os linfócitos ou células T são fundamentais ao funcionamento do sistema imunológico e são um elemento-chave da memória imunológica, sendo divididos em linfócitos T auxiliares ou T supressores. Eles mantêm o funcionamento e integridade do organismo, permitindo o desenvolvimento de respostas imunes, influenciam a regeneração e tolerância celular, limitam ciclos de expansão celular e induzem diferenciação ou geração de propriedades funcionais (LOPES *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2008).

A resposta alérgica mediada por IgE ocorre em duas etapas. Na primeira exposição de um indivíduo alérgico a um determinado antígeno, após transposição das barreiras gastrointestinais, o antígeno é processado por proteases endossômicas em peptídeos, nas células apresentadoras de antígenos, e são apresentados às células T pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, presente na superfície da célula. Linfócitos TCD4<sup>+</sup> helper são ativados pelo reconhecimento destes complexos peptídeos-MHC pelos receptores dos linfócitos T e estes exercem várias funções efetoras por meio de várias atividades biológicas de citocinas secretadas. Linfócitos TCD4<sup>+</sup> alérgeno-específicos que produzem citocinas tipo-Th2 desempenham um papel importante no desencadeamento e progressão de doenças alérgicas. A citocina Th2 mais importante é a IL-4, que aciona a comutação de classe da IgE por linfócitos B estimulados por alérgenos. A IgE liga-se com elevada afinidade aos receptores de IgE localizados na superfície de mastócitos em tecidos e basófilos no sangue (TANABE, 2008; URREGO ÁLVAREZ *et al.*, 2009).

Na segunda exposição do indivíduo alérgico ao alérgeno, a ligação dos antígenos às Imunoglobulinas E presentes na superfície de mastócitos e basófilos, fornecem o gatilho para ativação dessas células, resultando na liberação de mediadores inflamatórios a partir de grânulos secretores que contêm mediadores como a histamina, que são responsáveis pelos sintomas da alergia (TANABE, 2008; URREGO ÁLVAREZ *et al.*, 2009).

O trato gastrointestinal e o sistema imunológico, em condições normais, são capazes de oferecer barreiras contra os antígenos (MOREIRA, 2006; URREGO ÁLVAREZ *et al.*, 2009). No lúmen, há a presença de várias

substâncias nocivas, como os antígenos, agentes químicos que são ingeridos com alimentos, microrganismos e seus produtos tóxicos. O sistema gastrointestinal apresenta várias barreiras para combater esses agentes agressores, como o muco, as enzimas gástricas (pepsinas), pancreáticas (tripsina, quimitripsina e carboxipeptidases) e a produção de IgA (SPRINGER, 1994; MOREIRA, 2006).

Os sintomas desencadeados por alergia alimentar são diversos, dentre eles podem ser destacados reações cutâneas (urticária, angioedema, eczema), sintomas respiratórios (asma, rinite), sintomas gastrointestinais (vômito, diarreia, cólica) e reações sistêmicas (sintomas cardiovasculares, incluindo choque anafilático) (BESLER, 2001; SCHUBERT-ULLRICH *et al.*, 2009). Reações fatais foram retratadas para leguminosas (amendoim, soja), castanhas, ovos, leite, crustáceos, peixes, sementes e frutas (kiwi) (SAMPSON, 1998; BESLER, 2001).

As doenças alérgicas são de alta complexidade e sua manifestação e expressão clínica dependem da interação de fatores genéticos e ambientais. Alguns fatores devem ser ressaltados, a herança genética pode exercer um papel na expressão de alergia, a dieta da gestante e da nutriz, a idade da introdução de alimentos sólidos e alimentos alergênicos têm sido investigados como fatores ambientais que influenciam no desenvolvimento da alergia alimentar. Outro fator que pode ser destacado é a microbiota intestinal que pode agir sobre antígenos alimentares reduzindo sua alergenicidade, de forma que os efeitos probióticos podem trazer benefícios como a restauração da permeabilidade intestinal, equilíbrio da microbiota, melhora das funções de barreira do epitélio intestinal e modulação da resposta inflamatória (SOLÉ *et al.*, 2002).

Quando há a suspeita de alergia alimentar, devido ao relato de sintomas típicos dessa doença, é preciso que haja uma avaliação diagnóstica e a história clínica, neste caso, é fundamental (SAMPSON, 1998; SOLÉ *et al.*, 2002). É importante que o paciente ou seus pais tenham um registro dos alimentos consumidos rotineiramente ou eventualmente, para que seja feito um diagnóstico onde possam ser diferenciadas as manifestações causadas por hipersensibilidade alimentar das relacionadas a outras condições. É importante que o médico tenha habilidade e sensibilidade que o capacitem a interpretar

essas informações. E, em casos onde a causa da reação alérgica não for aparente, deve-se realizar uma avaliação minuciosa de todos os ingredientes ou aditivos presentes na dieta do paciente, pois muitas vezes a causa pode ser devido a um ingrediente presente em pequena quantidade ou a um contaminante (SAMPSON, 1998; SOLÉ *et al.*, 2002; KUROWSKI & BOXER, 2008)

Os testes de detecção de IgE para alergias alimentares devem ser interpretados levando em conta as manifestações clínicas do paciente, pois alguns obtêm testes de IgE positivos para alimentos, apesar de nunca terem tido reação clínica. Ainda, a IgE permanecerá positiva em pacientes que desenvolveram tolerância a alergia alimentar (KUROWSKI & BOXER, 2008).

Para o diagnóstico laboratorial de alergia alimentar, a determinação da IgE específica vem sendo utilizada. Esta atua apenas na identificação das alergias alimentares mediadas por IgE, de tipo I ou imediatas, e nas reações mistas. A análise de IgE específica a um determinado alimento, pode ser realizada *in vivo*, por meio da realização dos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata, e *in vitro*, pela dosagem da IgE específica no sangue. Para confirmação do diagnóstico ou para seu acompanhamento, outros marcadores sorológicos vêm sendo utilizados, como a histamina liberada por basófilos, anticorpos séricos IgG e IgG4 específicos, complexos antígeno-anticorpo, entre outros (SAMPSON, 1998; SOLÉ *et al.*, 2002; DA SILVA PEREIRA *et al.*, 2008; KUROWSKI & BOXER, 2008).

Um teste considerado bastante fiel para o diagnóstico de alergia alimentar é o teste de provocação oral, onde são ofertados alimentos e/ou placebo em doses e intervalos controlados, sob supervisão médica, onde há o monitoramento de possíveis reações clínicas. Outra prova utilizada é a avaliação funcional e morfológica do tubo digestivo, para avaliar sua integridade, função e repercussões decorrentes de alergia alimentar, principalmente ao leite de vaca (SICHERER, 1999; SOLÉ *et al.*, 2002).

O tratamento da alergia alimentar consiste na interrupção do alimento causador e no alívio dos sintomas. Nos casos mais graves, o paciente deve ser mantido sob observação e, caso haja piora do quadro, este deve ser hospitalizado (PATEL & VOLCHECK, 2015). Deve ser realizada uma avaliação rápida para determinar a extensão e a gravidade da reação, necessidade de

oxigenação, débito cardíaco e perfusão tecidual, uso de medicamentos e possível causa da reação. A terapia inicial deve ser direcionada para a manutenção das vias respiratórias e sistema circulatório. A epinefrina (adrenalina) é o medicamento utilizado para o manejo da anafilaxia, na forma de injeção intramuscular. Uma vez que tenha ocorrido a administração de epinefrina, outros fármacos podem ser utilizados como alguns anti-histamínicos (SAMPSON, 1998). Quando há a presença de sintomas respiratórios, deve ser utilizada a nebulização com agente broncodilatador, enquanto na presença de manifestações gastrintestinais, o alimento deve ser suspenso e os sintomas tratados (SAMPSON, 1998; SOLÉ *et al.*, 2002).

Em indivíduos com alergia alimentar, mesmo que haja a exclusão de um determinado alimento, pode ocorrer a exposição acidental. Portanto, aqueles pacientes para os quais o risco de reação anafilática é alto devem portar braceletes ou cartões que os identifiquem e, em alguns casos, os pacientes são orientados a portar medicamentos, como a adrenalina (SAMPSON, 1998; DA SILVA PEREIRA *et al.*, 2008).

A legislação brasileira traz uma lista dos principais alimentos causadores de alergia alimentar, como: trigo, centeio, cevada, aveia, crustáceos, ovos, peixes, amendoim, leite e castanhas (BRASIL, 2015).

### 3.2.1 Epidemiologia

O conhecimento sobre alergia alimentar vem aumentando ao longo do tempo. Entretanto, informações sobre a epidemiologia dessa doença ainda são restritas (LACK, 2008; ALLEN & KOPLIN, 2012). Apesar da existência de estudos relatando a prevalência de alergias a alguns alimentos como castanhas, ovo e leite em países do ocidente, não são encontradas pesquisas internacionais que expõem informações sobre prevalência de alergia alimentar de forma precisa, devido à carência de dados de estudos de população, principalmente de países subdesenvolvidos (LACK, 2008; LEE & KIM, 2016).

Nos estudos sobre a prevalência de alergia alimentar, devido às diferentes metodologias aplicadas, diferentes resultados são encontrados. Alguns trabalhos são baseados no histórico de pacientes, que não é muito preciso, outros utilizam testes positivos para IgE e testes cutâneos, mas o



padrão ouro para esse tipo de estudo é o teste duplo-cego placebo controlado (LACK, 2008).

Rona *et al.* (2007) realizaram uma meta-análise envolvendo 51 artigos, de diferentes países, para estimar a prevalência de alergia alimentar, empregando diferentes critérios. A prevalência de alergia, levando em conta os autorrelatos, variou de 1,2 a 17 % para leite, de 0,2 a 7 % para ovo, de 0 a 2 % para amendoim e peixes, de 0 a 10 % para mariscos, e de 3 a 35 % para qualquer alimento alergênico.

Em uma revisão sistemática realizada com estudos publicados na Europa, de 2000 a 2012, a estimativa da prevalência de alergia alimentar para todas as idades e grupos estudados, considerando autorrelatos, foi de 6 % para leite, 2,5 % para ovo, 3,6 % para trigo, 1,5 % para soja, 0,4 % para amendoim, 1,3 % para castanhas, 2,2 % para peixes e 1,3 % para mariscos (NWARU, 2014).

Liu *et al.* (2010), em um estudo de coorte realizado nos Estados Unidos, estimaram uma prevalência de alergia alimentar clínica de 2,5 % para a população estudada, baseando-se em quatro alimentos que causam alergia (leite, ovo, amendoim e camarão). Gupta *et al.* (2011), em uma pesquisa eletrônica em casas de cuidado nos Estados Unidos, aferiram que 8 % das crianças possuíam alergia alimentar, 2,4 % tinham alergia alimentar a vários alimentos e 3 % eram portadores de alergia alimentar severa.

Em um estudo de caso-controle para avaliar a presença de IgE sérica específica a alérgenos inalantes e alimentares em uma população de crianças atendidas em serviços de alergologia pediátrica em diferentes regiões do Brasil, no qual participaram 457 crianças, o resultado foi positivo para 79 % dos pacientes e 25,8 % dos controles. Os alimentos com maiores prevalências foram peixe, ovo, leite de vaca e trigo (NASPITZ *et al.*, 2004).

Bernd *et al.* (2010), em um levantamento feito entre alergologistas radicados nas regiões Central, Sul e Sudeste do Brasil, por meio de registros de pacientes que foram buscar atendimento especializado em virtude de terem sofrido reação anafilática, verificou-se a ocorrência de três principais grupos de agentes desencadeantes em todas as faixas de idade: medicamentos, venenos de insetos e alimentos.

No Levantamento Online Latino-Americano de Anafilaxia (OLASA), para avaliação das principais manifestações, agentes causadores e tratamentos de

pacientes com reações alérgicas severas, que foram atendidos por alergistas, envolvendo 634 pacientes, de 15 países da região, dentre eles o Brasil, foi identificado que em 23,3 % dos casos o agente causador de anafilaxia foi um alimento (SOLE *et al.*, 2011).

### 3.2.2 Alergia a proteínas do ovo

O ovo é um dos alimentos com maior prevalência de alergia alimentar na população em geral. Para indivíduos sensibilizados, a presença de ovos como ingrediente ou contaminante em alimentos processados pode desencadear danos à saúde ou consequências mais severas como reação anafilática (LI *et al.*, 2008; AZARNIA *et al.*, 2013). Sampson, Mendelson e Rosen (1992) reportaram uma reação anafilática fatal em uma menina de dois anos, após ingestão de hambúrguer contendo proteínas do ovo.

A quantidade mínima para causar reações alérgicas sofre variações e depende das características de cada indivíduo (MORISSET, 2003). A prevalência estimada de alergia a ovo na população, em geral, varia entre 1,6 a 3,2 %, o que torna esse alimento como um dos maiores causadores de alergia (MINE & YANG, 2008; AZARNIA *et al.*, 2013). A dose mínima retratada para causar reações em indivíduos sensibilizados é inferior a 2 mg (MORISSET, 2003; TAYLOR, 2004).

Os principais alimentos que contêm ovo na sua composição são comidas doces, merengues, sorvetes, *milk-shake*, cremes, produtos de confeitaria, massas alimentícias, tortas, pastéis, molhos (maionese), gelatinas, alguns cereais, massas, salsichas, patês, cafés com cremes. Algumas proteínas do ovo podem aparecer como componentes em outros alimentos e podem ser indicadas no rótulo. A lisozima e outras proteínas do ovo podem também estar presentes em alguns medicamentos (supositórios, soluções nasais e algumas preparações anestésicas), por isso a lista de componentes e excipientes deve ser lida principalmente por pacientes alérgicos (MARTORELL ARAGONÉS *et al.*, 2001).

O processamento de alimentos, como o tratamento térmico, pode alterar o potencial alergênico de algumas proteínas (Mine *et al.*, 1990). A alergenicidade pode aumentar, diminuir ou permanecer inalterada após processos como

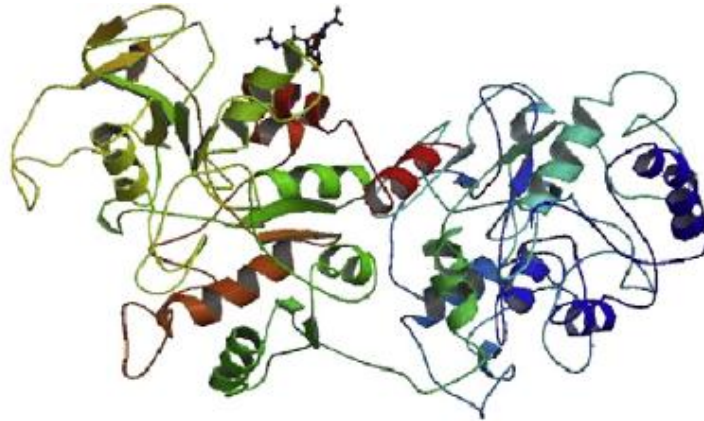
pasteurização, esterilização ou homogeneização. Além disso, os alergênicos, ao entrarem em contato com outros ingredientes presentes nos alimentos, podem sofrer alterações (POMS *et al.*, 2004a)

Mine e Zhang (2002) em um estudo para comparar a antigenicidade e alergenicidade de proteínas do ovo submetidas a diferentes tratamentos, constataram que a lisozima e ovotransferrina tiveram sua antigenicidade diminuída após carboximetilação e tratamento térmico. O aquecimento e a modificação química da ovomucóide diminuíram sua antigenicidade, enquanto a desnaturação com uréia não promoveu alterações. A OVA teve sua antigenicidade diminuída após tratamento térmico e carboximetilação, mas o tratamento com uréia aumentou a capacidade de ligação dessa proteína à IgG humana.

Apesar da presença de proteínas na gema do ovo, a clara possui maior quantidade de proteínas alergênicas, porém não é conhecida antigenicidade de todas elas (MARTORELL ARAGONÉS *et al.*, 2001). Os principais alergênicos presentes na clara do ovo incluem as proteínas OVA, ovomucóide, ovotransferrina e lisozima, enquanto o alergênico de destaque na gema é a  $\alpha$ -livetina (70 kDa) (MARTORELL ARAGONÉS *et al.*, 2001; POMS *et al.*, 2004; LEE & KIM, 2010).

A ovotransferrina (**Figura 1**) corresponde a 12 % do total de proteínas da clara. Ela consiste de 686 aminoácidos com 15 pontes dissulfeto e não contém grupos sulfidrilas livres. Seu ponto isoelétrico é de aproximadamente 6,0 e sua massa molecular é 78 kDa (TONG *et al.*, 2012; WU & ACERO-LOPEZ, 2012). A ovotransferrina é uma glicoproteína ferro-ligante, que contém 2,63 % de carboidratos e pode-se ligar a dois íons férricos (TONG *et al.*, 2012). Algumas atividades biológicas dessa proteína já foram reportadas, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, imunomoduladora, anticâncer, e antioxidante (WU & ACERO-LOPEZ, 2012).

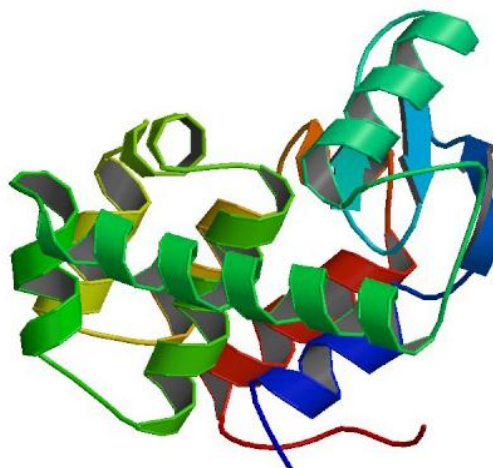
**Figura 1.** Estrutura tridimensional da ovotransferrina



Fonte: WU & ACERO-LOPEZ (2012).

A lisozima (**Figura 2**) é uma cadeia polipeptídica única com 129 aminoácidos unida por quatro pontes de dissulfeto, com peso molecular de aproximadamente 14,4 kDa. Ela corresponde a 3,5 % do total de proteínas da clara do ovo e é conhecida pelas suas propriedades antimicrobianas, mas também possui atividade antiviral, antitumoral e imunomodulatória (AABIN *et al.*, 2004; LEE & KIM, 2010; YU, 2014). Devido à sua característica conservante, a lisozima é utilizada em uma grande variedade de alimentos como frutas frescas, vegetais, carnes e frutos do mar (KERKAERT *et al.*, 2010). A frequência de reatividade a essa proteína, em indivíduos sensibilizados, é de 15 % (POULSEN *et al.*, 2001).

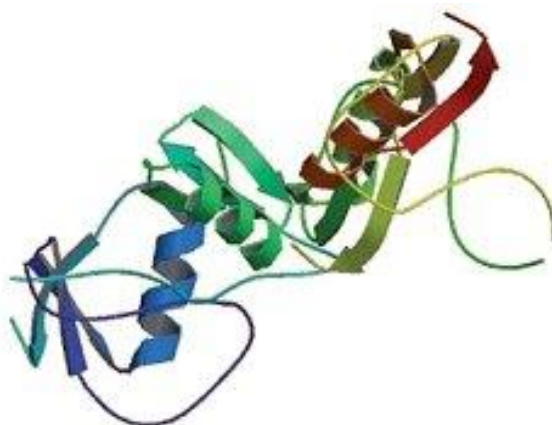
**Figura 2.** Estrutura tridimensional da lisozima



Fonte: HIDETAKA (2013).

A ovomucóide (**Figura 3**) é uma glicoproteína (22 a 29 % de carboidratos) com 186 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 28 kDa, correspondente a 11 % do total das proteínas da clara. Essa proteína possui atividade inibitória da tripsina, catalase e quimiotripsina (LI *et al.*, 2008; YU, 2014). Diferentemente da OVA, ovotransferrina e lisozima, a ovomucóide, relativamente, não coagula após aquecimento e é resistente a enzimas digestivas (LEE & KIM, 2010). Essa proteína tem sido identificada como uma das principais causadoras de alergia dentre as proteínas presentes no ovo, e acredita-se que seja devido à sua estabilidade contra desnaturação, agregação, degradação proteolítica e aquecimento (KATO *et al.*, 2001).

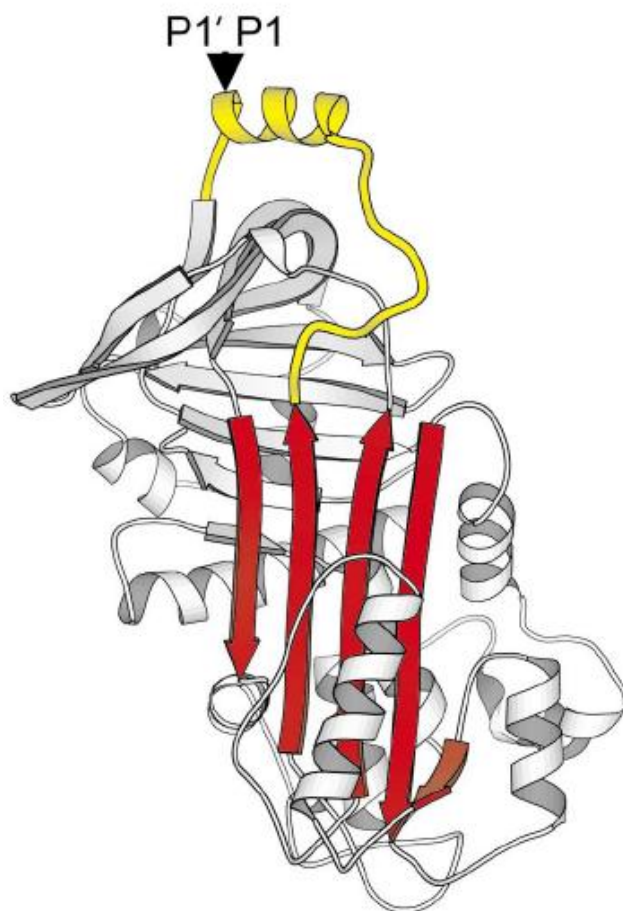
**Figura 3.** Estrutura tridimensional da ovomucoide



Fonte: <http://www.chemistryviews.org/details/ezone/1492619/html>

A OVA é a proteína que está presente no ovo em maior quantidade, correspondendo a 54 % do total das proteínas da clara (MARTORELL ARAGONÉS *et al.*, 2001; LEE & KIM, 2010). Ela foi uma das primeiras proteínas a ser isolada na sua forma pura, e devido à sua grande disponibilidade, a referida proteína é utilizada como preparação padrão em estudos de estrutura e propriedades das proteínas e em modelos experimentais de alergia (HUNTINGTON & STEIN, 2001). A ovoalbumina (**Figura 4**) é classificada com uma fosfoglicoproteína, sendo composta por 386 resíduos de aminoácidos, resultando em uma massa molecular de 45 kDa, com grupos sulfidrilas livres (YU, 2014).

**Figura 4.** Estrutura tridimensional da ovoalbumina



Fonte: Huntington e Stein (2001). P1-P1': Ligação peptídica reativa que é atacada por proteases

Muitas das reações alérgicas a alimentos mediadas por IgE, particularmente em crianças, são causadas pela OVA (AZARNIA *et al.*, 2013), sendo estimada uma frequência de reatividade a esta proteína, em indivíduos sensibilizados, de 32 % (POULSEN *et al.*, 2001). Após o aquecimento, ocorre a desnaturação das moléculas de ovoalbumina e essas podem se agregar de duas formas: em fios finos ou partículas mais densas dependendo das condições utilizadas para o tratamento térmico (COGRUENNEC *et al.*, 2007).

### 3.2.2.1 Estudos de degradação das proteínas do ovo

O processamento de alimentos, como o tratamento térmico, pode desnaturar proteínas, causar alterações na solubilidade e reatividade, alergenicidade e antigenicidade das proteínas alergênicas. Esses efeitos podem causar alterações nos resultados analíticos (POMS *et al.*, 2004a), sendo importante investigar os efeitos do processamento de alimentos nos resultados analíticos e no desempenho de métodos analíticos empregando amostras de matrizes alimentares reais (BUGYI *et al.*, 2010).

Em um estudo para comparar a composição e alergenicidade da proteína da clara do ovo crua em amostras de clara de ovo submetidas a vários tipos de tratamento térmico com diferentes temperaturas e duração, foi avaliada qual fator exerceria influência mais significativa na composição e alergenicidade das proteínas. Foram avaliadas amostras fervidas por 10 e 30 minutos, amostras submetidas ao processo de fritura em óleo vegetal por 3 minutos, e assadas a 170 °C por 20 minutos. Foi observada uma diminuição da atividade antigênica da OVA em quase todas as amostras aquecidas, exceto nas que foram fervidas por 10 minutos, cujo resultado foi o mesmo das amostras cruas, sendo que na clara de ovo fervida por 30 minutos o decréscimo foi maior. Para a ovomucoide, não foi observada diminuição da antigenicidade em nenhum dos tratamentos e sim um aumento (SHIN *et al.*, 2013).

Bugyi *et al.* (2010) realizaram um estudo onde foram produzidos *cookies*, a base de farinha de trigo, incorporados com proteínas alergênicas (ovo e leite) em diferentes concentrações. Os pesquisadores avaliaram os efeitos de diferentes etapas do processamento na detecção das proteínas alergênicas por ELISA. Foram realizadas cinco fornadas para cada concentração e analisadas amostras em cada etapa do experimento (mistura do pó, massa crua e *cookie*). Na massa crua foi observado um pequeno decréscimo das proteínas alergênicas em relação à mistura diluída, e nos *cookies*, após assamento, o decréscimo foi elevado. A recuperação obtida na mistura foi de 94,46% e 78,57%, para proteínas do leite e ovo, respectivamente, já nos *cookies*, os valores encontrados foram de 36,37 e 2,16 %.

Khuda *et al.* (2012) conduziram um trabalho para avaliar o desempenho de kits comerciais de ELISA na detecção de alergênicos incorporados em

*cookies* doces processados sob diferentes condições. Foram preparados *cookies* controle e *cookies* onde foram incorporadas proteínas do amendoim, ovo e leite em diferentes concentrações. As amostras foram assadas a 190°C por 25 e 30 minutos. Para a detecção das proteínas do ovo, foram utilizados kits de ELISA Elisa-Sys<sup>®</sup>, Morinaga<sup>®</sup>, Neogen<sup>®</sup>, R-Biopharm<sup>®</sup> e Tepnel<sup>®</sup>. Os níveis detectados de proteína do ovo foram bastante reduzidos após 30 minutos de assamento, com as recuperações dos kits variando entre 3,5 a 20,5 % nos níveis estudados.

Gomaa e Boye (2013) realizaram um estudo para investigar os efeitos do tempo e temperatura de assamento, massa e dimensões de *cookies* na detecção de quatro alergênicos (caseína, ovo, glúten e soja), simultaneamente incorporados em *cookies*, a base de farinha de trigo sem glúten, utilizando ELISA e citometria de fluxo. Foram preparados *cookies* de diferentes tamanhos e massas, com e sem alergênicos, e estes foram assados a 177°C por 10, 15 e 25 minutos. Para a análise das proteínas alergênicas do ovo foram utilizados kits de ELISA Veratox<sup>®</sup> e Morinaga<sup>®</sup>. As recuperações obtidas nas amostras que não foram assadas foram representadas por 81 % utilizando o Veratox<sup>®</sup>, 42 % com o Morinaga<sup>®</sup> e 92 % empregando citometria de fluxo. Os intervalos de recuperação para as amostras que foram processadas variaram entre 8 e 48 % para o kit Morinaga, 0 e 5 % para o kit Veratox<sup>®</sup>, e 0 e 5 % para a citometria de fluxo.

Em um estudo realizado por Török *et al.* (2014) foram produzidos *cookies* contendo proteínas alergênicas isoladas (leite, ovo, soja e glúten) ou de forma múltipla na mesma matriz e avaliou-se o efeito da presença simultânea de quatro alergênicos e o efeito do processamento nas etapas da mistura dos ingredientes, na massa crua e no biscoito assado. Para a detecção de proteínas do ovo foram utilizados kits de ELISA R-Biopharm<sup>®</sup> e Romerlabs<sup>®</sup>. Não foi observada reação cruzada para os kits de análise de proteína do ovo. E as recuperações obtidas nas amostras que continham apenas proteína do ovo foram de 200 a 226 %, de 133 a 147 % e de 0 % para mistura, massa crua e *cookie* assado, respectivamente.

Török *et al.* (2015) conduziram um trabalho no qual foram produzidos *cookies* contendo um alergênico ou quatro simultaneamente (leite, soja, ovo e glúten). Para a quantificação foram utilizados kits de ELISA AgraQuant<sup>®</sup>, e



foram avaliados a mistura dos ingredientes, a massa (na forma de freeze-dried) e o *cookie* assado. As recuperações obtidas utilizando o kit para proteína do ovo para as amostras que continham apenas essa proteína foram de 62 %, 52 % e 0 % para mistura, massa crua e *cookie* assado, respectivamente. Já nas amostras contendo vários alergênicos as recuperações obtidas foram 43 %, 35 % e 0 % para mistura, massa crua e *cookie* assado, respectivamente.

### **3.3 Métodos para análise de alergênicos**

Para assegurar o cumprimento da rotulagem de alimentos alergênicos, regulamentada por alguns países, e aumentar a proteção dos consumidores, são necessários métodos de detecção e quantificação confiáveis. Entretanto, a detecção de alergênicos em produtos alimentares pode ser bem difícil, uma vez que frequentemente os alérgenos estão presentes em quantidades traços ou são mascarados pela matriz alimentar. Outro ponto a ser destacado é o quão sensível o método de detecção tem que ser, já que existem poucos dados estabelecendo níveis limites, os quais tenham sido determinados por estudos de provocação oral em humanos (TAYLOR *et al.*, 2002; POMS *et al.*, 2004)

Para indivíduos alérgicos, a exclusão total dos constituintes alérgenos de alimentos é difícil, uma vez que o consumo de alimentos que supostamente estariam livres de tais proteínas podem ser contaminados com constituintes externos, durante as etapas de estocagem, transporte e distribuição; ainda, podem sofrer contaminação cruzada durante o processamento, decorrente de uma limpeza inadequada de equipamentos (POMS *et al.*, 2004)

Existe um grande número de métodos disponíveis para a detecção e quantificação de alergênicos alimentares. No entanto, não há a disponibilidade de muitos métodos que cumprem com todos os requisitos de desempenho necessários, havendo, então, confiabilidade limitada (KERBACH *et al.*, 2009; TÖRÖK *et al.*, 2015). Estima-se que os métodos usados na detecção de alergênicos em alimentos devam ter limite de detecção próximos a 1-100 mg/kg, sendo uma faixa de concentração muito baixa para grande parte das técnicas disponíveis (POMS *et al.*, 2004). Além da dificuldade de desenvolvimento de técnicas seletivas e sensíveis para essa finalidade,

também se carece de materiais de referência que possibilitem a otimização e validação desses métodos (COSTA *et al.*, 2012). Os alergênicos podem causar sérios problemas de segurança alimentar, mesmo em baixas concentrações, portanto há a necessidade de que os métodos tenham um bom desempenho analítico, com boa seletividade, sensibilidade, precisão e veracidade. Além disso, os métodos devem ser simples e práticos, ter um bom custo-benefício e cobrir uma ampla faixa de trabalho, envolvendo diferentes alimentos processados, com variadas composições (KERBACH *et al.*, 2009).

Muitas vezes a análise de alergênicos alimentares é complicada, devido às questões regulatórias, pois nas legislações são definidos apenas os componentes que devem ser rotulados e não são declarados valores limites, significando que há uma “tolerância zero” para essas proteínas, o que não pode ser garantido pela capacidade das técnicas analíticas atuais. Clinicamente, não foram estabelecidos os limiares de alergênicos, tornando a área um grande desafio. Do ponto de vista da química analítica, o valor zero por si só não pode ser interpretado. A incerteza dos métodos disponíveis deve ser levada em consideração para a regulação, de maneira que seja aplicável para todas as partes interessadas da análise de alergênicos (TAYLOR *et al.*, 2014; TÖRÖK *et al.*, 2015)

As proteínas alergênicas, comumente, estão presentes em alimentos em pequenas quantidades e não se pode assumir que suas distribuições sejam homogêneas. As fases mais importantes durante o preparo da amostra são a homogeneização e a extração da proteína de interesse. A solubilidade de algumas proteínas pode ser diferente mesmo na sua forma nativa, e as etapas do processamento podem induzir mudanças que alteram essa propriedade. Além disso, componentes da matriz podem interagir com as proteínas que serão analisadas, influenciando na etapa de extração. Portanto, a escolha adequada de tampões e técnicas de extração é fundamental (AZARNIA *et al.*, 2013; MATTAROZZI *et al.*, 2014).

Os métodos atualmente utilizados para a detecção de potenciais alergênicos em alimentos buscam detectar o alergênico ou marcadores que indicam sua presença. Esses marcadores são, normalmente, proteínas específicas para o alimento alergênico de interesse ou fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) característicos (SCHUBERT-ULLRICH *et al.*, 2009).

A maioria dos métodos desenvolvidos para a análise de alergênicos em alimentos é demorada, trabalhosa e demanda equipamentos de alto custo e mão de obra treinada para operá-los. Desta forma, tem sido dada uma ênfase no desenvolvimento de métodos analíticos que podem ser aplicados de uma forma mais simples e miniaturizada, de maneira a permitir aos órgãos reguladores e talvez os próprios consumidores, o monitoramento de produtos alimentícios quanto à presença de alergênicos ocultos ou usados como ingredientes, e representando também aos fabricantes uma ferramenta para o controle no próprio local de produção, para evitar a contaminação cruzada (SCHUBERT-ULLRICH *et al.*, 2009).

Métodos envolvendo IgE específica de soro humano podem detectar alergênicos enquanto análises bioquímicas ou biomoleculares só podem detectar uma determinada proteína e não um alérgeno por si só (BESLER, 2001). Apesar de o marcador ideal ser a proteína alergênica, muitas vezes detectar o alérgeno por si só nem sempre é viável, pois muitas vezes suas propriedades químicas podem não ser bem caracterizadas ou o método possui limite de detecção insuficiente. Além disso, muitos alimentos alergênicos contêm várias proteínas alergênicas que podem variar abundantemente. Neste contexto, proteínas específicas ou fragmentos de DNA são moléculas alvo como marcadores para a presença de potenciais alimentos ou ingredientes alergênicos (POMS *et al.*, 2004).

Os métodos baseados na detecção de proteínas, geralmente envolvem protocolos de técnicas imunoquímicas como o teste radioalergossorvente (RAST), o teste enzimático-alergossorvente (EAST), o *rocket* imunoeletroforese (RIE), o *immunoblotting* e o ELISA. Enquanto o RIE e o *immunoblotting* concedem apenas resultados qualitativos ou semiquantitativos, as demais técnicas imunoquímicas como RAST, EAST e ELISA podem ser empregadas com propósitos quantitativos. Métodos fundamentados na detecção do DNA são baseados na amplificação de um determinado fragmento de DNA específico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Com a PCR em tempo real podem ser obtidos resultados quantitativos com veracidade adequada (POMS *et al.*, 2004). Essa técnica não mostrou ser adequada para detecção de alérgenos do ovo, pois a presença de carne de frango pode produzir resultados falso-positivos (LEE & KIM, 2010).

O RAST e o EAST são imunoenaios que detectam IgE-específica a alérgenos no soro humano. A ligação da IgE-específica aos alergênicos alimentares, ligados à fase sólida, é mensurada. Esses testes *in vitro* são ferramentas empregadas para o diagnóstico de alergia em indivíduos sensibilizados a alimentos. O uso dessas técnicas é limitado por depender de soro de humanos alérgicos e pela dificuldade de padronização dos ensaios (BESLER, 2001).

Na técnica REI há o emprego de um gel contendo anticorpos. Os antígenos das amostras, que serão analisadas, migram de acordo com sua mobilidade eletroforética até que ocorra a precipitação de complexos antígeno-anticorpo no gel. São formados precipitados na forma de “foguetes” a uma razão constante antígeno/anticorpo. As alturas dos “foguetes” são proporcionais às quantidades de antígeno aplicadas. Essa técnica não é amplamente utilizada devido à complexidade das etapas de preparo do gel e de imunocoloração (POMS *et al.*, 2004).

A eletroforese com dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) permite a identificação de alergênicos individuais após imunotransferência para membranas de nitrocelulose (BESLER, 2001). O SDS é capaz de desnaturar as proteínas, conferindo a elas uma carga bastante negativa. As proteínas são separadas de acordo com a massa molecular, independentemente da sua carga original. Após a separação, essas são transferidas para uma membrana para serem detectadas (POMS *et al.*, 2004).

A técnica de biossensores, que é emergente na área de alergia alimentar, também tem sido utilizada. Essa consiste de um dispositivo integrado (transdutor) que fornece informações, quantitativas seletivas, pela utilização de um bioreceptor. Com a utilização do método, é possível a detecção de compostos que interagem com uma molécula-alvo (anticorpo específico para um alérgeno ou uma cadeia de DNA simples capaz de hibridizar com um fragmento específico de um determinado alérgeno) imobilizada. No entanto, ainda existem poucos métodos disponíveis que utilizam os biossensores, apesar do seu alto grau de automação, facilidade e velocidade de uso (MONACI & VISCONTI, 2010).

A espectrometria de massas (MS) permite a análise de diferentes proteínas alergênicas, concomitantemente, sendo esta uma vantagem em

relação às técnicas anteriormente discutidas. Cumpre destacar, contudo, o elevado custo do equipamento e insumos, além da necessidade de pessoal altamente especializado. Esta técnica inclui a identificação de proteínas, caracterização e quantificação, porém presume-se que em grande parte dos casos, a presença de proteínas a partir de um ingrediente alergênico será inferida por meio da detecção de peptídeos derivados relevantes. Esses peptídeos são produzidos pela ação de endoproteases específicas na proteína alvo e são detectados por MS, após separação por cromatografia líquida (JOHNSON *et al.*, 2011).

### 3.3.1 ELISA

A técnica de ELISA passou a ser bastante utilizada na área bioquímica e biomédica na década de 80, devido à sua alta especificidade, sensibilidade, e simplicidade de manipulação. Ainda, o potencial para padronização e automação permite que ela seja empregada com propósitos de triagem. A referida técnica analítica tem sido a mais utilizada para medições de rotina e triagens de alergênicos em alimentos (SCHUBERT-ULLRICH *et al.*, 2009). Vários testes foram desenvolvidos para a detecção e quantificação tanto de proteínas inteiras extraídas de alimentos quanto de alimentos alergênicos específicos (BESLER, 2001).

Devido à facilidade de uso e por serem relativamente rápidos, os kits de ELISA tornaram-se disponíveis comercialmente para uma grande variedade de alergênicos alimentares, com diferentes limites de detecção, dependendo do alergênico e da matriz alimentar. Os testes para a presença de alergênicos ou proteínas marcadoras específicas de um determinado alimento utilizam anticorpos específicos que, normalmente, são produzidos em mamíferos, como camundongos e coelhos (TINI *et al.*, 2002; VAN COILLIE *et al.*, 2004; SCHUBERT-ULLRICH *et al.*, 2009).

A etapa de detecção no teste de ELISA envolve uma reação colorimétrica, na qual ocorre a ligação de alergênicos ou proteínas marcadoras específicas com anticorpos, marcados com enzima, que conferirá cor ao complexo formado após a adição de um cromógeno. A concentração do complexo antígeno-anticorpo pode ser determinada pela leitura da absorbância

da solução do cromógeno formado, baseando-se em uma curva padrão gerada com padrões de referência (POMS *et al.*, 2004; SCHUBERT-ULLRICH *et al.*, 2009).

Para a análise e detecção de alérgenos e alimentos alergênicos duas abordagens do ELISA são mais utilizadas, o ELISA competitivo e o sanduíche (SCHUBERT-ULLRICH *et al.*, 2009). O ensaio sanduíche é o mais comumente utilizado, nele um anticorpo de captura específico para a proteína de interesse é adsorvido em uma fase sólida. Proteínas específicas na amostra são capturadas por este anticorpo e detectadas por um segundo anticorpo, marcado com uma enzima, específico para a proteína que se liga a ela formando um “sanduíche”. Após a formação do complexo, é adicionado um cromógeno que será convertido em composto colorido pela enzima. A absorbância medida será proporcional à concentração do analito (POMS *et al.*, 2004a).

O ELISA competitivo é mais comumente utilizado para detecção de proteínas relativamente pequenas. O teste consiste em uma fase sólida onde há anticorpos específicos para o antígeno de interesse. A amostra é adicionada juntamente com um inibidor (proteína marcada com enzima). Se não houver antígenos na amostra, as proteínas marcadas com enzima terão ligação máxima à fase sólida, resultando na formação de coloração intensa após adição do cromógeno e, conseqüentemente, maior será a absorbância. Nesse teste, a absorbância é inversamente proporcional à concentração de antígenos na amostra (POMS *et al.*, 2004).

Li *et al.* (2008) realizaram um estudo para avaliar o grau de contaminação de ovomucóide em amostras comerciais de ovoalbumina purificadas, utilizando ELISA sanduíche, e o valor médio encontrado foi de 11% do total de proteínas. Azarnia *et al.* (2013) realizaram um estudo para avaliar o efeito do processamento térmico na detecção de OVA em massa alimentícia contendo clara de ovo ou ovo inteiro. Foram utilizados kits comerciais de ELISA sanduíche e não foram detectadas proteínas do ovo nas amostras de massas alimentícias que foram cozidas. Os resultados foram consistentes com outros obtidos por MS.

Ao utilizar o técnica ELISA é preciso que seja levado em conta que o método pode sofrer limitações na sua performance analítica, particularmente no

caso de alimentos processados. Para isso é necessário que as possíveis fontes de erro sejam investigadas, utilizando modelos de matrizes alimentares que simulem produtos alimentares reais e ferramentas estatísticas adequadas. O tipo de matriz alimentar, o processamento e o método analítico, como por exemplo o tipo de kit de ELISA utilizado, podem afetar significativamente os resultados (TÖRÖK *et al.*, 2015).

### **3.4 Rotulagem de alimentos alergênicos**

A terapia de exclusão é a principal ferramenta no tratamento da alergia alimentar, de forma que os consumidores alérgicos não devem ser expostos a alimentos que podem desencadear reações. Assim, para proteção dos consumidores, é importante que sejam encontradas nos alimentos informações referentes aos ingredientes com potencial alergênico ou outros ingredientes que possam estar presentes de forma acidental. As agências reguladoras trabalham, juntamente com a indústria, para assegurar que a rotulagem de alimentos contenha informações suficientes, de maneira clara e consistente aos consumidores, e para que os produtores adotem medidas de controle visando à prevenção da presença de alergênicos que não são declarados (GENDEL, 2013).

Vários países e órgãos internacionais reconhecem a importância de fornecer informações sobre alergênicos por meio da rotulagem, adotando leis, regulamentos ou padrões. Como vários alimentos podem ser alergênicos, governos e agências reguladoras reconhecem a necessidade de direcionar as legislações de rotulagem para um número limitado de alimentos alergênicos, considerados prioritários. Para a identificação desses alergênicos alimentares, diferentes medidas são tomadas pelos diferentes governos ou organizações (GENDEL, 2012).

O primeiro país a estabelecer a rotulagem obrigatória de alimentos alergênicos e a regulamentá-la por meio de uma legislação foi o Japão, em 2002. Segundo essa legislação, a rotulagem é obrigatória para sete alimentos: camarão, caranguejo, trigo, trigo sarraceno, ovo, leite e amendoim. Também há a recomendação de rotulagem de alguns alimentos como lulas, castanha de

caju, frango, soja, banana, entre outros (AKIYAMA *et al.*, 2011; IOFI, 2013; SAKAI *et al.*, 2013).

Em 1996, nos Estados Unidos, devido ao reconhecimento da importância sobre a rotulagem de alimentos, o *Food and Drug Administration* (FDA) emitiu aviso aos fabricantes solicitando que eles declarassem todos os alergênicos na lista de ingredientes, mesmo se esses estivessem presentes como coadjuvantes de processamento que não precisassem ser declarados no rótulo (FDA, 1996).

Nos Estados Unidos, os requisitos para a rotulagem de alimentos alergênicos, estabelecidos pelo FDA, foram regulamentados em 2004 pelo Ato de Proteção ao Consumidor e Rotulagem de Alimentos Alergênicos (FALCPA). Nessa legislação são identificados os principais alimentos ou grupos de alimentos de maior preocupação de saúde pública, e ingredientes que contenham proteínas provenientes desses alimentos. No FALCPA são definidos os formatos dos rótulos quanto a declaração da presença de um alergênico alimentar seja na lista de ingredientes ou imediatamente após a palavra “contém” (FDA, 2006).

O Codex Alimentarius preconiza algumas diretrizes para a rotulagem de alimentos embalados. A norma se aplica à rotulagem de todos os alimentos pré-embalados que são oferecidos ao consumidor. Nessa norma é definido que alimentos que podem causar alergia como: cereais, ovo, leite e derivados, castanhas, peixes e derivados, crustáceos, amendoim, soja e sulfito, devem ser declarados. Quando houver a presença de qualquer alimento ou ingrediente obtido a partir de qualquer um dos alergênicos citados, esses devem ser declarados. E se não for possível fornecer informações adequadas sobre a presença de alergênico por meio da rotulagem, o alimento não deve ser comercializado (CODEX, 2010).

A União Europeia lançou, em 2007, com a finalidade de proteger os consumidores, a Diretiva EC 2007/68 que altera a Diretiva EC 2003/89. No anexo III desta diretiva é incluído uma lista de ingredientes ou produtos que podem ser classificados como alergênicos ou podem causar intolerância, como cereais contendo glúten, crustáceos, ovos, peixes, amendoim, soja, leite, castanhas, aipo, mostarda, sésamo, sementes de gergelim, enxofre, dióxido de sulfito e moluscos. Nessa publicação é exigido que no rótulo haja o termo



“contém”, seguido do nome do ingrediente, porém esta indicação não é necessária quando os ingredientes figurarem com o seu nome específico na lista de ingredientes ou na denominação de venda do produto em questão (EU, 2007).

No ano de 2011, foi promulgada na União Europeia a Diretiva EC 2011/1169 relativa à prestação de informação aos consumidores sobre os gêneros alimentícios. Esta legislação traz uma atualização em relação à Diretiva EC 2007/68. Na legislação anterior era exigido que a advertência, quanto à presença de ingredientes alergênicos, estivesse presente apenas no produto final. Entretanto, na Diretiva de 2011 é ressaltada a importância do fornecimento de informação sobre a presença de potenciais alergênicos nos produtos alimentícios pré-embalados, pois é sugerido que a maior parte dos incidentes relacionados a alergia alimentar envolva esse tipo de produto (EU 2007, 2011).

#### 3.4.1 Rotulagem de alimentos alergênicos no Brasil

Até recentemente, no Brasil não existia uma legislação que exigisse a declaração obrigatória, na rotulagem, de ingredientes alergênicos presentes em alimentos. Considerando a prevalência de alergia alimentar no país, o cenário regulatório internacional e as alternativas regulatórias existentes, uma vez que na legislação sobre rotulagem geral de alimentos não existe nenhum dispositivo específico sobre alergênicos, havia uma necessidade de implantação de uma nova abordagem a respeito do tema (BRASIL, 2002, 2014a).

Após demandas da sociedade, por meio de Ações Civas Públicas para determinar que a ANVISA regulamentasse a declaração obrigatória de alergênicos e derivados nos rótulos de produtos; de ações dos consumidores, liderados pela Campanha Põe no Rótulo, que propõe que seja regulada a informação sobre alergênicos de forma clara, completa e legível; e de discussões internas da ANVISA, foi proposta a adoção de medidas para concluir uma proposta de resolução sobre a rotulagem de alimentos alergênicos para ser submetida à consulta pública (BRASIL 2013, 2014a, 2014b).

Em 2015, foi aprovada pela ANVISA a RDC nº 26/2015 (BRASIL, 2015) referente à rotulagem de alimentos que causam alergias alimentares e que vigorou a partir de 2016:

- trigo, centeio, cevada, aveia e suas estirpes hibridizadas;
- crustáceos;
- ovos;
- peixes;
- amendoim;
- soja;
- leites de todas as espécies de animais mamíferos;
- amêndoa (*Prunus dulcis*. sin.:*Prinus amygdalus*. *Amygdalus communis* L.);
- avelãs (*Corylus* sp.);
- castanha-de-caju (*Anacardium occidentale*);
- castanha-do-brasil ou castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*);
- macadâmias (*Macadamia* spp.);
- nozes (*Juglans* spp.);
- pecãs (*Carya* spp.);
- pistaches (*Pistacia* spp.);
- pinoli (*Pinus* spp.)
- castanhas (*Castanea* spp.)
- látex natural

Os alimentos ingredientes, aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia que contenham ou sejam derivados dos alimentos listados acima devem conter a declaração: “Alérgicos: Contém” seguido dos nomes comuns dos alimentos alergênicos; “Alérgicos: Contém” seguido dos nomes comuns dos alimentos alergênicos ou “Alérgicos: Contém” seguido dos nomes comuns dos alimentos alergênicos e derivados (BRASIL, 2015).

Ainda segundo a legislação vigente no Brasil, quando não for possível garantir que não haja contaminação cruzada dos alimentos, ingredientes, aditivos alimentares ou coadjuvantes de tecnologia por alérgenos alimentares, deve estar presente no rótulo a seguinte declaração: “Alérgicos: Pode conter”

seguido dos nomes comuns dos alimentos alergênicos. A utilização dessa declaração deve ser baseada em um Programa de Controle de Alergênicos (BRASIL, 2015).

### 3.5 Biscoitos

#### 3.5.1 Definições, produção e consumo

Biscoitos ou bolachas são definidos na Resolução nº 263, de 22 de setembro de 2005 da ANVISA, como os produtos obtidos pela mistura de farinha(s), amido(s) e/ou fécula(s) com outros ingredientes, submetidos a processos de amassamento e cocção, fermentados ou não, podendo apresentar cobertura, recheio, formato e textura diversos (BRASIL, 2005).

O termo biscoito ou *biscuit* é utilizado em vários locais como: Reino Unido, Austrália, Nova Zelândia e África do Sul para descrever um produto assado que contenha cereal (trigo, aveia ou cevada) como base, em uma porcentagem de pelo menos 60 % e um baixo teor de umidade de 1 a 5 %, excluindo qualquer mistura de recheio ou cobertura. Geralmente possui um alto teor de gordura, ao comparar com outros produtos do gênero, uma longa vida de prateleira e alto valor calórico. Nos EUA o termo utilizado para esse produto é *cookie*, enquanto biscoito refere-se a um produto tipo pão fermentado, semelhante ao *scone* (bolinho) do Reino Unido. (MANLEY 2001; BIRT, 2010).

A palavra *biscuit* (biscoito em inglês) deriva-se do latim “coctus bis” ou do francês “bescoit”, que significa duas vezes cozido. Isso faz referência à prática que era utilizada há muitos anos atrás, onde os biscoitos eram assados em forno quente e depois eram transferidos para um forno mais frio, processo que não é mais utilizado (BIRT, 2010; WADE, 1988). O termo *cookie* é derivado de uma palavra holandesa, *koekje*, o que significa bolinho (BIRT, 2010).

O Brasil é um dos principais produtores de biscoitos no mundo. Em 2014, o país ocupou a terceira posição no *ranking* mundial, atrás apenas de Estados Unidos e China. O consumo per capita no país é de aproximadamente 8 kg/ano. No referido ano, o mercado brasileiro vendeu cerca de 19 bilhões de reais, apresentando um crescimento de mais de 10 % em relação ao ano anterior. O volume comercializado foi de 1,7 milhões de toneladas. De acordo

uma experiente empresa da área de mercado, a Euromonitor, o mercado de biscoitos brasileiro é o segundo maior do mundo com vendas atingindo 9,19 bilhões de dólares, atrás apenas dos Estados Unidos (14,1 bilhões de dólares) (ABIMAPI, 2015; ABIMAPI, 2016).

A exportação brasileira de biscoitos, em 2014, gerou cerca de 96 milhões de dólares, sendo que os principais países importadores do produto foram Angola, Estados Unidos e Paraguai. No mesmo ano, o país importou cerca de 35 milhões de reais de biscoito e os principais países que comercializaram o produto para o Brasil foram Alemanha, Polônia e Itália (ABIMAPI, 2016).

O biscoito é um alimento que é consumido por grande parte da população brasileira, está presente em vários lares, em suas diversas variedades. Segundo a Kantar Worldpanel, a presença dos biscoitos nas residências atinge a marca de 99,6 %. Devido a fatores como longo prazo de validade, custo benefício e o hábito de consumo, esse produto se enraizou no dia a dia da população brasileira (ABIMAPI, 2015).

### 3.5.2 Classificação

No Reino Unido, os biscoitos são divididos em duas categorias, os de massa dura, que possuem a massa semelhante à do pão, com consistência dura, uma rede de glúten bem desenvolvida durante a mistura, e os de massa curta, que é semelhante à massa de bolo, mas com uma menor quantidade de água, o nome é uma referência aos altos níveis de gordura em relação ao teor de farinha, que reduz a extensibilidade de massa (BIRT, 2010).

#### 3.5.2.1 *Massa dura*

Os biscoitos com massa dura são caracterizados por terem massa elástica, extensível e rica em glúten após a mistura. Os níveis de gordura e açúcar são baixos ou relativamente baixos em relação ao teor de farinha. Uma quantidade considerável de água é utilizada com a finalidade de formar uma massa maleável, pois ela hidrata as proteínas da farinha, e a partir da mistura há a formação da rede de glúten (MANLEY, 2001).

Ao considerar os ponto de vista dos consumidores, esses produtos variam de substitutos de pão, com longa vida de prateleira (*Cream Crackers*, Água e

sal) que têm pouco ou nenhum açúcar e baixo teor de gordura, à biscoitos torrados que possuem baixos teores de açúcar e gordura e são conhecidos por biscoitos semidoces (Maria, Maizena, amanteigados). No grupo também estão incluídos os biscoitos salgados (*snacks, pretzels*) (MANLEY, 2001).

No preparo dessas massas, geralmente, são utilizadas a laminação e o corte. Um grande problema no controle do processo é manter o tamanho e forma do biscoito, devido à elasticidade variável decorrente da presença do glúten, e a massa contrai após o corte e durante a fase inicial do assamento. Essa contração vai depender da qualidade da farinha e na modificação do glúten durante a mistura. Outro ponto importante a ser considerado é a remoção adequada de água durante os estágios finais do assamento, devido ao alto teor presente na massa (MANLEY, 2001).

#### 3.5.2.2 *Massa curta*

As massas dos biscoitos desse grupo carecem de extensibilidade e elasticidade, e quebram aos serem puxadas, por isso é utilizado o termo “curto”. É empregada uma quantidade significativa de gordura, que contribui para o encurtamento da massa. Para que a textura adequada seja atingida é importante que a rede de glúten não seja muito desenvolvida na etapa de mistura, isto não ocorre se houver um alto teor de gordura e baixo teor de água, porém se a quantidade de gordura for baixa a mistura não deve ser muito intensa. Para substituição da gordura podem ser utilizados emulsificantes como a lecitina de soja (MANLEY, 2001; BIRT, 2010)

A expansão da massa pode ocorrer durante o processo de assamento. Não é comum que ocorra o encurtamento, como nas massas duras, isso pode ocorrer caso o a mistura seja muito intensa. O recipiente de assamento, os teores de açúcar e de gordura podem influenciar na expansão da massa (MANLEY, 2001).

Os biscoitos deste grupo são os que estão mais presentes no mercado de biscoitos mundial. O grupo é bem variável e diversificado e os biscoitos são usados em processamentos secundários. Nesta categoria estão os biscoitos que são moldados, os biscoitos recheados e os com cremes (MANLEY, 2001).

### 3.5.2.3 Biscoitos semidoces

Os biscoitos semidoces são caracterizados por conterem massa com uma rede de glúten bem desenvolvida, entretanto, o glúten se torna menos elástico e mais extensível à medida que há o aumento dos teores de gordura e açúcar. Um requisito básico para esse tipo de biscoito é a superfície lisa e levemente brilhante e uma textura que não seja nem muito dura e nem muito macia frente à mordida. Isso é atingido pelo equilíbrio entre o processamento e a receita (MANLEY, 2001; BIRT, 2010). Os biscoitos semidoces estão presentes no mercado de diversos países, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao baixo custo. Como exemplo pode ser citado o biscoito Maria, o Petit Beurre (biscoito comum na França) e o Rich Tea (comumente consumido na Inglaterra) (MANLEY, 2001).

Na fabricação de biscoitos, os principais ingredientes utilizados são: farinha de trigo, açúcar, gordura, água e sal, os quais são misturados com outros ingredientes (fermento, leite em pó desnatado, emulsificante e metabisulfito), em menor quantidade, para formar uma massa que tenha uma rede de glúten bem desenvolvida (MAMAT *et al.*, 2010).

A farinha de trigo é o ingrediente que está presente em maior quantidade em biscoito e a sua composição vai influenciar na qualidade do produto. Sua proteína é essencial na formação da estrutura do glúten (CAUVAIN & YOUNG, 2006). Nos biscoitos semidoces, se o teor de proteína for superior a 10 %, pode haver problemas na laminação da massa, mesmo utilizando o metabisulfito (MANLEY, 2001).

O açúcar pode ser utilizado em várias formas: cristal, refinado, granulado, mascavo, xarope, e também são utilizados açúcares provenientes de amido e outros carboidratos (dextrose, glicose, xarope de malte) (CAUVAIN & YOUNG, 2006; MARCELINO & MARCELINO, 2012). O açúcar confere sabor doce e coloração para os biscoitos, mas também influencia na estrutura, ele também pode formar ligações com a água presente na mistura, limitando a formação da estrutura do glúten (CAUVAIN & YOUNG, 2006).

A gordura adicionada aos biscoitos contribui para as características sensoriais do produto, lubrificação e aeração, o tipo utilizado determinará a qualidade final. Esse ingrediente influencia na estrutura da massa. Com a

redução do teor de gordura, a dureza da massa diminui. Ao mesmo tempo em que com teores mais elevados, pode ocasionar num amaciamento da consistência da massa (SUDHA *et al.*, 2014). Nos biscoitos semidoces deve ser utilizada a forma semi sólida, se for utilizada na forma de óleo, é preciso que seja adicionado açúcar à solução. Emulsificantes como a lecitina podem ser utilizados como alternativa no encurtamento da massa (MANLEY, 2001).

O sal é utilizado na formulação de biscoitos com uma variedade de propósitos. Ele contribui para o aroma, controle da atividade de água e, conseqüentemente, para a vida de prateleira. O sal também atua no controle da fermentação e no processo de formação do glúten (CAUVAIN & YOUNG, 2006).

A água exerce um importante papel na formulação de biscoitos, ela atua na solubilização e dispersão dos ingredientes durante o processo de mistura, na formação da rede de glúten, pois hidrata proteínas e carboidratos, e contribui para características sensoriais e para a vida de prateleira do produto (CAUVAIN & YOUNG, 2006).

No preparo de biscoitos, são utilizados fermentos como o bicarbonato de sódio e bicarbonato de amônio. A utilização destes compostos tem a finalidade de promover a expansão do produto e neutralizar a acidez (CAUVAIN & YOUNG, 2006).

### **3.6 Validação de métodos**

Validação de métodos é uma condição importante na química analítica, e um componente essencial das medições que um laboratório deve implementar com intuito de produzir dados analíticos confiáveis (EURACHEM, 1998; THOMPSON *et al.* 2002; SOUZA, 2007) Todos os dias, são realizadas diversas medidas em vários laboratórios ao redor do mundo, com muitas finalidades relacionadas à área de saúde, economia, criminalística e outras áreas (EURACHEM,1998; SOUZA, 2007). Em todas as áreas de análise são necessários métodos analíticos confiáveis para o cumprimento dos regulamentos nacionais e internacionais. E uma das medidas a serem tomadas para assegurar que um laboratório é capaz de fornecer dados com a qualidade exigida, é a validação de métodos. (THOMPSON *et al.* 2002; SOUZA, 2007).

A ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, norma internacional na qual são tratados os requisitos para implementação de sistemas de gestão da qualidade em laboratórios de ensaio e calibração, define validação como: a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que houve o cumprimento dos requisitos específicos para um determinado uso pretendido (ISO 2005a, 2005b; SOUZA, 2007). Para a confirmação de que os métodos são apropriados, o laboratório deve validar os métodos não normalizados, aqueles que foram criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório e os métodos normalizados adaptados ou utilizados fora do seu escopo (ISO 2005b; SOUZA, 2007).

As formas de validação recomendadas podem ser estruturadas em processos intra e interlaboratoriais (SOUZA, 2007). O estudo interlaboratorial consiste na organização, desempenho e avaliação de testes em uma mesma amostra por dois ou mais laboratórios de acordo com condições estabelecidas previamente para testar a eficiência do método. O estudo pode ser classificado, de acordo com o objetivo, em estudo colaborativo ou ensaio de proficiência. Validação intralaboratorial significa um estudo analítico envolvendo um único laboratório utilizando um método para analisar o mesmo ou diferentes materiais, sob diferentes condições, ao longo de determinados intervalos de tempo (EC, 2002; SOUZA, 2007).

### 3.6.1 Validação intralaboratorial

A validação intralaboratorial é adequada quando é necessário testar a viabilidade de um método antes da realização de um estudo colaborativo, que é mais dispendioso. Também é útil no fornecimento de evidências sobre a confiabilidade de determinados métodos analíticos quando não há a disponibilidade de dados de estudos colaborativos, ou quando não é possível realizar um. Outra utilidade seria assegurar que os métodos prontos para o uso, validados, estão sendo usados corretamente (THOMPSON *et al.* 2002).

Os estudos desse tipo de validação são adaptáveis a diferentes situações e é possível avaliar o desempenho de métodos em um curto intervalo de tempo. Para isso, é utilizado um número considerável de experimentos, diferentes combinações de analitos, concentrações e matrizes. Devido à



flexibilidade e habilidade em fornecer resultados rápidos para novos métodos, as validações intralaboratoriais atendem um importante segmento de processos de validação de métodos (VAN DER VOET *et al.* 1999; SOUZA, 2007).

No processo de elaboração de procedimentos de validação intralaboratorial de métodos analíticos, apesar de não existir uma uniformidade a respeito de quais características devem ser determinadas, vários documentos podem ser utilizados como referência. A principal referência no Brasil é o documento orientativo DOQ-CGCRE-008 da Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (INMETRO, 2016). Como referências internacionais podem ser destacados o guia publicado pela EURACHEM e o guia harmonizado publicado pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)*, ISO e *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* (EURACHEM, 1998; EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007; MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014).

Mesmo com os esforços tanto nacionais como internacionais para definir e harmonizar procedimentos de validação intralaboratoriais, a maioria dos protocolos possuem: definição dos parâmetros de desempenho; roteiros que não aprofundam no delineamento experimental e nas estatísticas aplicáveis; pontos de contradição; além de uma abordagem mais completa da validação quantitativa que da qualitativa (SOUZA, 2007).

Processos de validação intralaboratorial permitem avaliar a veracidade, precisão, linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, limites de detecção e de quantificação (VAN DER VOET *et al.*, 1999; SOUZA, 2007). Nesse tipo de validação, não é possível estudar o parâmetro de reprodutibilidade. Entretanto, esse tipo de informação nem sempre é necessária, sendo suficientes, em vários casos, os estudos de reprodutibilidade parcial (EURACHEM 1998; VAN DER VOET *et al.*, 1999; SOUZA, 2007).

### 3.6.2 Parâmetros de desempenho de métodos quantitativos

A EC (2002) define parâmetros de desempenho como uma qualidade funcional que pode ser atribuída a um método analítico. Geralmente, os parâmetros de desempenhos utilizados na validação intralaboratorial de métodos qualitativos são: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de trabalho, veracidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), incerteza e robustez (EC 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007; MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014).

#### 3.6.2.1 *Seletividade*

A seletividade de um método refere-se à extensão em que ele pode determinar analitos específicos em uma mistura complexa sem a interferência de outros componentes que estejam presentes (VESSMAN *et al.*, 2001). Na área de alimentos, é um parâmetro de grande importância, devido à complexidade das matrizes (SOUZA, 2007). Interferentes podem provocar um viés, aumentando ou diminuindo o sinal atribuído a um mensurando (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014).

Para avaliação da seletividade, são elaborados experimentos que consistem na diferenciação entre amostras brancas e adicionadas do analito em estudo. Também é avaliada a capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes, propositalmente adicionados à amostra (INMAN, 1987; GREEN, 1996; ICH, 1996; AOAC, 1998; BRUCE *et al.*, 1998, EURACHEM, 1998; EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; SHABIR, 2003; TAVERNIERS *et al.*, 2004; SOUZA, 2007; INMETRO, 2016). Entretanto, a capacidade de medir um analito pode ser comparada com outros métodos e técnicas independentes, quando não houver disponibilidade de interferentes (INMAN, 1987, AOAC, 1998; EURACHEM, 1998; HUBER, 1998; TAVERNIERS *et al.*, 2004; SOUZA, 2007).

#### 3.6.2.2 *Limites e incerteza*

A capacidade de um método analítico em detectar um composto ou analito que esteja presente em uma amostra, mesmo que seja em baixas

concentrações, é relacionada aos limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção (GREEN, 1996; EC, 2002; SOUZA, 2007; INMETRO, 2016).

Em análises onde os analitos estão presentes em pequenas quantidades nas amostras, é importante que se conheça qual o menor valor de concentração que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2016).

Quando são realizadas medições em concentrações baixas, alguns aspectos devem ser considerados. É necessário estabelecer um valor do resultado que indica um nível de analito que seja diferente de zero. Outro aspecto importante é conhecer a menor concentração do analito que pode ser detectada, por um método a um determinado nível de confiança, termo definido como limite de detecção. Também é importante estabelecer o menor nível no qual o método possui uma performance adequada para uma determinada aplicação. Esse conceito é usualmente referido como limite de quantificação (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014).

Para a análise dos limites, devem-se utilizar, preferencialmente, amostras brancas, ou seja, matrizes que não contenham nenhum analito que possa ser detectável ou amostras de teste com concentrações de analito próximas ou abaixo do limite de detecção esperado (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014).

A incerteza é um parâmetro que deve ser estimado, pois com ela é possível cobrir todas as fontes de erros inerentes do processo analítico, além das obtidas nos processos de validação de métodos. Trata-se de um importantíssimo indicador tanto para adequação para uso de um método quanto para a confiabilidade dos resultados analíticos obtidos em um laboratório (TAVERNIERS *et al.*, 2004; SOUZA 2007).

A incerteza de um resultado pode vir de diversas fontes, por exemplo: definição incompleta do mensurando, amostragem, efeito de matriz, interferentes, condições ambientais, incerteza de massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações e suposições incorporadas ao método e procedimento, e variação aleatória (ELLISON & WILLIAMS, 2012).

### 3.6.2.3 *Faixa de trabalho e faixa linear*

Em métodos quantitativos há a existência de uma faixa de concentração do analito ou valores da propriedade onde o método pode ser aplicado (INMETRO, 2016). A faixa de trabalho é um intervalo no qual o método é capaz de fornecer resultados com uma incerteza adequada. O valor mais inferior dessa faixa é definido pelo limite de quantificação, e o valor superior é definido pelas concentrações onde são observadas anomalias significativas na sensibilidade analítica (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014).

Nos experimentos de determinação da faixa de trabalho, inicialmente é escolhida uma faixa preliminar. E a faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação onde se pretende utilizar o método, e é importante que a concentração esperada da amostra esteja situada no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2016).

Segundo EURACHEM 1998, INMETRO (2016) e TAVERNIERS *et al.*, (2004), na faixa de trabalho deve estar contida uma faixa de resposta linear. Porém, apesar de THOMPSON, ELLISON & WOOD (2002) relatarem que a faixa de trabalho não é necessariamente idêntica à faixa linear, eles destacam que dentro da faixa linear existe uma faixa de trabalho. Enquanto o intervalo de concentração da calibração é mais amplo, a validação pode cobrir uma faixa mais restrita (SOUZA, 2007).

### 3.6.2.4 *Precisão, veracidade e recuperação*

A precisão é o grau de concordância entre resultados de testes independentes obtidos sob condições pré-estabelecidas. Geralmente é especificada em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativa. Pouca precisão é determinada por um desvio padrão alto (EC, 2002; THOMPSON, *et al.*, 2002; SOUZA, 2007).

A repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade são as formas mais comuns de representar a precisão (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014; INMETRO, 2016). Espera-se que a repetibilidade contribua com a menor variação nos resultados, ela é a medida da variabilidade em resultados, quando a medida é realizada por um mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade tende a contribuir com a

maior variação nos resultados e, consiste na medida da variabilidade em resultados entre laboratórios. A precisão intermediária fornece uma estimativa da variação em resultados quando são realizados estudos intralaboratoriais, mas com mais variáveis que nos de repetibilidade. O objetivo é estimar uma precisão que represente todas as fontes de variação que ocorrem em um único laboratório (como diferentes analistas, longo intervalo de tempo, diferentes equipamentos) (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014).

A veracidade de um método expressa a concordância entre uma média de um conjunto de resultados e o valor de referência, sendo expressa em termos de tendência (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014; EC, 2002).

Na avaliação da veracidade e precisão, é sugerido que sejam realizados experimentos com materiais de concentração conhecida do analito, em replicatas, sob condições predeterminadas (GREEN, 1996; ICH, 1996; NATA, 1997; AOAC, 1998; BRUCE *et al.*, 1998; EURACHEM, 1998; HUBER, 1998; EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; SHABIR, 2003; TAVERNIERS *et al.*, 2004; SOUZA, 2007; INMETRO 2016). São utilizados materiais certificados (materiais de referência certificados) e não certificados (materiais de referência, amostras brancas e amostras adicionadas), que também são conhecidos como amostras de controle de qualidade e são utilizados para estudos de recuperação aparente (TAVERNIERS *et al.*, 2004; SOUZA, 2007).

A recuperação é definida como a porcentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico. Ela é determinada durante a validação, quando não há a disponibilidade de material de referência certificado (EC, 2002). Para estimar a recuperação de um determinado analito, é feita a análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas dele, o que é denominado *spike*. Uma limitação deste experimento é que o analito adicionado não está, necessariamente, na mesma forma que aquela presente na amostra. Assim, em casos onde o analito esteja presente em uma forma na qual ele seja detectável mais facilmente, esta estratégia pode ocasionar avaliações demasiadamente otimistas de recuperação (INMETRO, 2016).

A acurácia consiste na combinação de erros sistemáticos e aleatórios, portanto está relacionada à combinação dos parâmetros precisão e veracidade (EURACHEM, 1998; ISO 1993; RSC, 2003; SOUZA, 2007).

### 3.6.2.5 Robustez

A robustez corresponde na capacidade de um método em permanecer inalterado diante de pequenas, mas deliberadas variações em seus parâmetros. Ela é capaz de indicar a confiabilidade de um método durante seu uso normal (EURACHEM, 2014). É um parâmetro importante quando se avaliam as informações sobre o efeito de parâmetros experimentais essenciais para a estimativa da incerteza (EURACHEM/CITAC, 2000; SOUZA, 2007).

Os limites para os parâmetros experimentais devem estar presentes no protocolo do método. E esses desvios permitidos, separados ou combinados, não devem produzir nenhuma mudança significativa nos resultados produzidos. A robustez de um método é testada, deliberadamente, introduzindo pequenas mudanças no procedimento e examinando o efeito nos resultados. Com exemplo de fatores que podem ser abordados em um teste de robustez temos: mudanças na marca e concentração de um reagente, pH de uma solução, temperatura de reação, dentre outros (THOMPSON, *et al.*, 2002).

### 3.6.3 Parâmetros de desempenho de métodos qualitativos

Devido à capacidade dos métodos qualitativos em obter resultados rápidos e objetivos, com minimização de erros, simplicidade, baixo custo e com pequenos intervalos entre a amostragem e a análise, eles têm sido bastante utilizados como métodos de triagem (PULIDO *et al.*, 2003; GONDIM, 2012; GONDIM *et al.*, 2014).

Segundo Gondim (2012) e Gondim *et al.* (2014), quando é utilizada a abordagem qualitativa na validação intralaboratorial de métodos, alguns parâmetros devem ser levados em conta, dentre eles limite de detecção (LD) e região de perda de confiabilidade (RPC), acordância (ACO) e concordância (CON), taxa de confiabilidade (TCF), taxa de seletividade (TST), taxa de sensibilidade (TSB), taxa de falsos negativos (TFN) e taxas de falsos positivos (TFP).

Em análises qualitativas, o conceito de incerteza é utilizado de uma forma diferente das quantitativas, ou seja, ela é expressa como uma dispersão de resultados. Ao se trabalhar com métodos qualitativos, tem sido proposta a

utilização do termo RPC, o qual é baseado na probabilidade de obtenção de falsos resultados. Dessa forma a incerteza é expressa como uma região onde há probabilidade de ocorrência de erros e não como um valor numérico. Para a estimativa da RPC é feita a construção de curvas de desempenho da porcentagem de resultados positivos versus o nível de concentração (PULIDO *et al.*, 2003; RÍOS *et al.*, 2003; GONDIM, 2012; GONDIM *et al.*, 2014).

A estimativa dos limites da RPC pode ser feita pelo cálculo das concentrações do analito onde há 5 % de chance de obter resultados falso-positivos (erro tipo  $\alpha$ ), e onde há 5 % de chance de obter resultados falso-negativos (erro tipo  $\beta$ ). Dependendo do tipo de erro considerado, o LD pode ser calculado como o limite inferior ou superior da RPC (GONDIM, 2012; GONDIM *et al.*, 2014).

Nos processos de validação de métodos qualitativos são aplicados os parâmetros ACO e CON, os quais correspondem aos conceitos de precisão sob condições de repetibilidade e de reprodutibilidade, respectivamente (GONDIM, 2012). O valor de ACO representa a repetibilidade de uma análise qualitativa, ou seja, a probabilidade de ser obtido o mesmo resultado ao trabalhar com duas amostras idênticas analisadas sob as mesmas condições de repetibilidade por um mesmo laboratório (LANGTON *et al.*, 2002; GONDIM *et al.*, 2014). A CON é equivalente à reprodutibilidade de um método de análise, e corresponde à probabilidade de obter um mesmo resultado, trabalhando com duas amostras idênticas analisadas por laboratórios diferentes (em estudos colaborativos sob condições de reprodutibilidade) ou em baterias analíticas diferentes (para estudos em um único laboratório sob condições de precisão intermediária) (ELLISON & FEARN, 2005; GONDIM *et al.*, 2014).

Nos métodos qualitativos são utilizados como parâmetros de desempenho as TST e TSB, os quais estão relacionados com as taxas de falsos resultados (GONDIM, 2011; GONDIM, 2012). A sensibilidade é a habilidade que o método possui em discriminar amostras verdadeiramente positivas como positivas, sendo muitas vezes denominada como poder do teste (TRULLOLS *et al.*, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005; GONDIM, 2011; GONDIM, 2012).

A seletividade de um determinado método analítico consiste na sua habilidade em reconhecer amostras verdadeiramente negativas como negativas, e a TST é a probabilidade em discriminar amostras que são verdadeiramente negativas como negativas (TRULLOLS *et al.*, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005; GONDIM, 2011; GONDIM, 2012).

Dois parâmetros de grande importância devem ser levados em conta quando se avaliam as propriedades de análises qualitativas: a TFP e a TFN. A probabilidade de obter um resultado negativo em uma amostra positiva ou a resposta negativa a um método de referência é a TFN. Essa taxa pode ser estimada utilizando a proporção de resultados errados para as amostras em que há a presença da substância em estudo. A TFP consiste na probabilidade de obtenção de um resultado positivo em uma amostra onde o analito não esteja presente, ou a resposta positiva a um método de referência. Ela pode ser estimada pela proporção de resultados errôneos para as amostras sabidamente negativas (TRULLOLS *et al.*, 2004; ELLISON & FEARN, 2005; GONDIM, 2011).

A confiabilidade é a principal propriedade das análises qualitativas, podendo ser relacionada à exatidão dos testes quantitativos. A definição desse parâmetro é a proporção de resultados corretos, sendo eles negativos ou positivos, em uma bateria de testes independentes (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; RÍOS & TÉLLEZ, 2005; GONDIM, 2012).

A robustez de um método qualitativo envolve um desenho experimental para avaliar diferentes fatores que sejam intrínsecos às condições analíticas do método, ou variáveis, que foram previamente escolhidas, como em um estudo fatorial completo (AGUILERA *et al.*, 2006; GONDIM *et al.*, 2014).



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Equipamentos

- a) Agitadores 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) 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 de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0045 (Gehaka BK 300).
- d) Balões volumétricos de 25 e 50 mL, calibrados por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0383.
- e) Banho termostático, com temperatura monitorada por termômetro externo calibrado (Nova Ética 314-8DN).
- f) Batedeira (Arno - Deluxe inox).
- g) Congelador ajustado em temperaturas entre -18 e -24 °C, com temperatura monitorada por termômetro tipo sonda externo calibrado (Electrolux, modelo FE 22).
- h) Centrífuga (Jouan BR 4).
- i) Forno elétrico (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 1000 a 10000 µL, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0422 (HTL Lab Solutions LM10000).
- m) Micropipeta de 100 a 1000 µL, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0383 (Thermo Scientific Finnpipe® F3).
- n) Micropipeta de 20 a 200 µL, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0486 (Thermo electron corporation Finnpipe®).

- o) Micropipeta multicanal de 30 a 300  $\mu\text{L}$ , calibrada por laboratório acreditado pela CGRE/INMETRO de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número LV34537-15 (Eppendorf, modelo Research).
- p) Processador de amostras (Cutter Sire).
- q) Refrigerador ajustado em temperaturas entre 2 e 8  $^{\circ}\text{C}$ , com temperatura monitorada por termômetro tipo sonda externo calibrado (Eletrolux DFF37 Premium).
- r) Seladora à vácuo (Ez Home 201).
- s) Sistema de purificação de água (Millipore Direct Q 3UV).
- t) 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) Assadeiras de inox.
- c) Batedor manual de inox.
- d) Béquer de vidro/plástico (50, 100, 250 e 1000 mL).
- e) *Bowl* de inox.
- f) Cortadores de inox (4 cm de diâmetro).
- g) Espátulas raspadora de silicone e de inox.
- h) Etiquetas para identificação dos ingredientes e amostras.
- i) Luva térmica.
- j) Luvas de nitrila
- k) Luvas de látex
- l) Mamadeira para camundongos.
- m) Microtubo para centrifugação 2,0 mL.
- n) Peneira (25 mesh).
- o) Ponteira descartável (10 a 200  $\mu\text{L}$ , 100 a 1000  $\mu\text{L}$  e 1 a 10 mL).
- p) Proveta de vidro (10, 50 e 100 mL).
- q) Rolo para massas de inox.
- r) Sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade.

s) Tubo cônico de polipropileno de 50 mL, com tampa.

### **4.3 Padrões, Reagentes e Insumos**

- a) Açúcar refinado (Guarani).
- b) Álcool etílico
- c) Anticorpo conjugado de peroxidase (RIDASCREEN®).
- d) Bicarbonato de amônio (Bombay).
- e) Bicarbonato de sódio (Bombay).
- f) Farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico (Rosa Branca).
- g) Kit RIDASCREEN® FAST Ei/Egg Protein da R-Biopharm (Art. No. R6402).
- h) Lecitina de soja (Caramuru Alimentos).
- i) Margarina (Becel).
- j) Metabisulfito de sódio (Pryme Foods).
- k) Ovo.
- l) Padrão de ovoalbumina pureza  $\geq 98\%$  (Sigma Aldrich - A2512).
- m) Sal (Cisne).
- n) Solução cromógena (RIDASCREEN®).
- o) Solução de parada (RIDASCREEN®).
- p) Soluções padrão (0; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5 ppm) de ovo em pó em solução aquosa (RIDASCREEN®).
- q) Tampão de extração do alergênico (RIDASCREEN®).
- r) Tampão de lavagem (RIDASCREEN®).

### **4.4 Parte experimental**

A parte experimental deste projeto foi realizada no Laboratório de Química Bromatológica da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e no Laboratório de Bromatologia – Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos (BRO-UPAA) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Anteriormente às etapas de produção de biscoitos e detecção de proteínas pelo método ELISA, foi realizada limpeza criteriosa das bancadas, materiais e equipamentos utilizados, com água ultrapura, detergente e álcool

etílico a 70 %, com a finalidade de eliminar qualquer possibilidade de contaminação.

#### 4.4.1 Formulação de biscoitos

As formulações dos biscoitos semidoces utilizadas nesse estudo encontram-se detalhadas na **Tabela 2**. As formulações foram baseadas nas descritas na literatura, para esse tipo de biscoito (MANLEY, 1996; MANLEY, 2001; CAUVAIN E YOUNG, 2006; DAVIDSON, 2015).

**Tabela 2.** Formulação dos biscoitos semidoces

Ingrediente	Quantidade (g)	
	A (0% de ovo fluido)	B (0,022% ovo fluido)
Farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico	210,7	1625,0
Açúcar refinado	49,9	385,1
Margarina	39,8	307,1
Ovo integral	0,0	0,59
Sal	2,1	16,2
Bicarbonato de sódio	1,1	8,1
Lecitina de soja	0,8	6,5
Metabisulfito de sódio	0,04	0,3
Bicarbonato de amônio	1,5	11,4
Água	44,0	339,6
Total	350	2700

Para determinação do nível de contaminação a ser estudado, considerou-se o percentual de proteínas totais do ovo e de proteínas da clara, para as quais o kit é específico (OVA e ovomucoide), a faixa de trabalho estabelecida pelo fabricante do kit RIDASCREEN®FASTEi/Egg Protein (R6402) da R-Biopharm (0,5 a 13,5 mg/kg) e estudos da degradação das proteínas da clara do ovo em matrizes alimentares durante o assamento (LEE & KIM, 2010;

KHUDA *et al.*, 2012; GOMAA & BOYE, 2013; GOMAA & BOYE, 2015; TÖRÖK *et al.*, 2015).

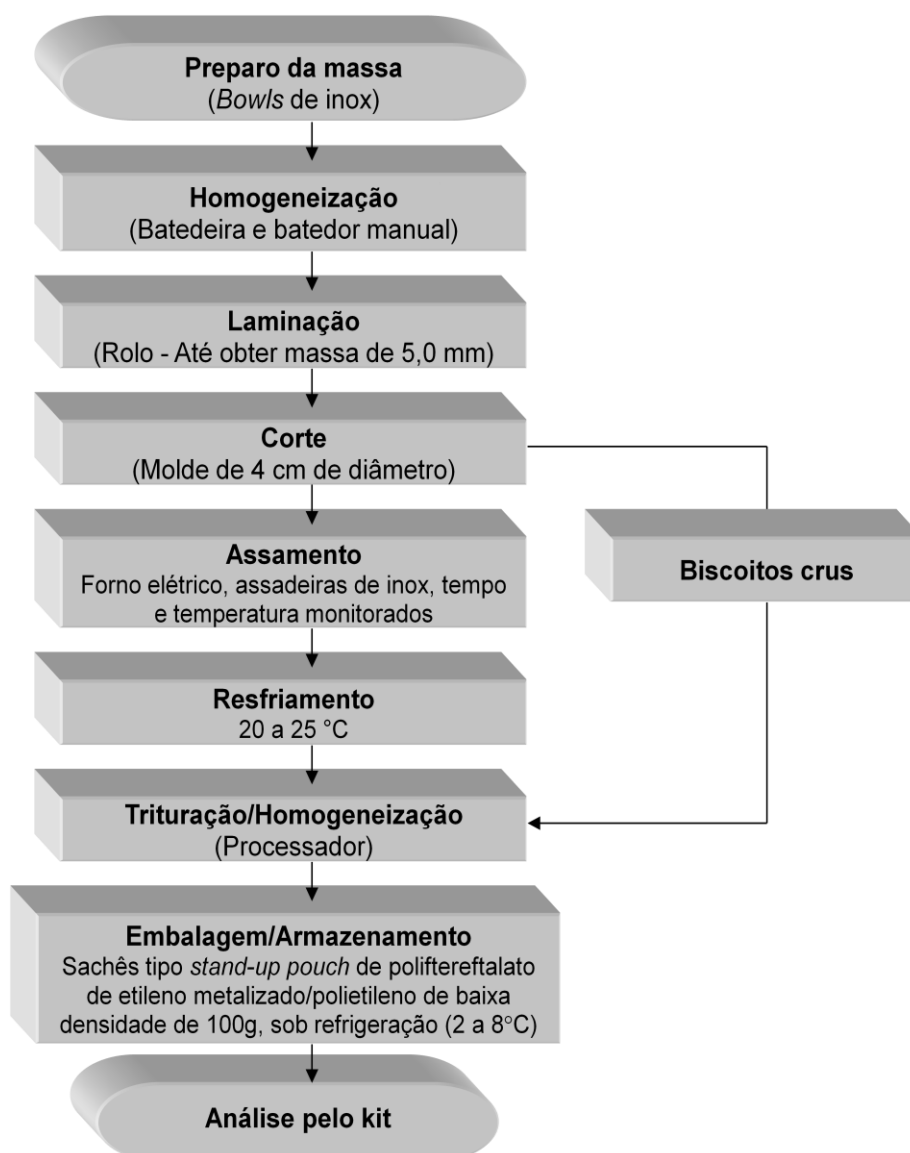
Todos os ingredientes utilizados na produção do biscoito foram pesados em balança analítica, individualmente. O bicarbonato de amônio foi dissolvido em uma pequena quantidade de água antes de ser adicionado à massa (MANLEY, 2001). Os ingredientes medidos foram transferidos para *bowls* de inox e misturados com auxílio de batedeira, durante 5 minutos, seguido de bateção manual até obtenção de massa uniforme, a qual chegou a uma temperatura de 30 °C. Após, as massas foram laminadas, com auxílio de rolo de inox e abridor mecânico de massas, até atingirem 5 mm de espessura. Foram utilizados cortadores de inox, com 4 cm de diâmetro, para cortar a massa, resultando em biscoitos crus de aproximadamente 15 g.

Parte dos biscoitos foi assada nas condições de tempo e temperatura definidas, conforme o experimento em questão. Os biscoitos foram colocados em assadeiras de inox e assados em forno elétrico, sendo a temperatura monitorada por termômetro a laser. Os biscoitos assados, com aproximadamente 11,0 g, foram resfriados em temperatura ambiente (20 a 25 °C). Espátulas raspadoras de inox foram usadas para remover os biscoitos das assadeiras, os quais foram triturados/homogeneizados em processador, durante 1 minuto, seguido de peneiramento (25 mesh).

A outra parte dos biscoitos, não foi assada, sendo mantida crua e homogeneizada 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. Finalmente, foram seladas e mantidas sob refrigeração (2 a 8 °C) até o momento dos ensaios (**Figura 5**).

**Figura 5.** Fluxograma do processo de produção de biscoitos semidoces



#### 4.4.2 Determinação de proteínas do ovo em biscoito por ELISA

Para a determinação de proteínas do ovo nos biscoitos foi utilizado o Kit RIDASCREEN® FAST Ei/Egg Protein da R-Biopharm (Art. No. R6402), o qual é específico para as proteínas ovoalbumina e ovomucoide. A faixa de quantificação declarada pelo fabricante foi de 0,5 a 13,5 mg/kg.

O fundamento do método baseia-se na ligação entre antígenos e anticorpos. Os poços da microplaca são revestidos com anticorpos específicos para proteínas da clara do ovo. Ao adicionar padrões e amostras aos poços, as proteínas da clara OVA e ovomucoide ligam-se aos anticorpos específicos. Na etapa de lavagem, os componentes não ligados são removidos. Assim, é

adicionado o anticorpo conjugado com peroxidase. Esse anticorpo conjugado liga-se ao complexo antígeno-anticorpo, formando um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo (sanduíche). Os conjugados não ligados são removidos em uma etapa de lavagem. É feita a adição do cromógeno que será convertido em um produto azul, pelo conjugado enzimático. A adição da solução de parada altera a coloração do produto de azul para amarelo. A medição é realizada por espectrofotômetro a 450 nm. A absorbância é proporcional à concentração de proteínas da clara do ovo na amostra e o resultado é expresso em mg/kg (ppm) de ovo em pó integral.

Na etapa de extração, pesou-se 1 g de cada amostra, previamente triturada e homogeneizada, em tubo tipo Falcon de 50 mL, sendo adicionados 20 mL do tampão de extração diluído (1:10), previamente aquecido a uma temperatura de aproximadamente 60 °C. Esses foram agitados em *shaker* e incubados a 60 °C por 10 minutos em banho termostático e, posteriormente, resfriados em banho de gelo. As amostras foram levadas para a centrifugação por 10 minutos a 2500 g a 4 °C.

No ensaio, 100 µL de cada extrato de amostra ou das soluções padrão fornecidas pelo kit foram adicionadas aos poços da microplaca, em duplicata, utilizando micropipeta e foram mantidas incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente (20 a 25 °C). Posteriormente, o líquido dos poços foi descartado e, para garantir sua completa remoção, a microplaca foi batida diversas vezes contra papel absorvente. Foram adicionados 250 µL do tampão de lavagem (composto de uma mistura de substâncias contendo timerosal) em cada poço e o líquido foi removido como na etapa anterior, utilizando lavadora de ELISA. Essa etapa de lavagem foi repetida mais duas vezes.

Foram adicionados 100 µL do conjugado enzimático em cada poço e a placa foi homogeneizada, suavemente, sendo incubada por 10 minutos em temperatura ambiente (20 a 25 °C). O líquido dos poços foi despejado para fora e, para garantir a completa remoção, a microplaca foi batida diversas vezes contra papel absorvente. Foram adicionados 250 µL do tampão de lavagem em cada poço e o líquido foi removido como na etapa anterior. Essa etapa de lavagem foi repetida mais duas vezes, utilizando lavadora de ELISA. Em seguida, adicionou-se 100 µL da solução de cromógeno em cada poço e a

microplaca foi homogeneizada, suavemente, e incubada por 10 minutos em temperatura ambiente (20 a 25 °C), no escuro.

Na etapa final, 100 µL da solução de parada foram adicionados em cada poço. A microplaca foi homogeneizada, suavemente, e mediu-se a absorbância a 450 nm, não deixando exceder 10 minutos após a adição da solução de parada. Foi utilizado o software RIDA®SOFT Win, nos quais foram inseridas as leituras de absorbância de cada poço para obtenção dos resultados de acordo com o modelo de regressão estabelecido pelo kit. A absorbância foi proporcional à concentração de proteínas da clara do ovo na amostra e o resultado foi expresso em mg/kg (ppm) de ovo em pó integral.

#### **4.5 Estudo de degradação de proteínas da clara do ovo em biscoitos semi doces**

##### **4.5.1 Delineamento experimental**

O estudo de degradação das proteínas do ovo encontra-se sumarizado na **Figura 6**. Foram formulados biscoitos semidoces com 0,022 % de ovo fluido, nível inferior ao prescrito para esse alimento como ingrediente (MANLEY, 2001), simulando contaminação do produto, e também biscoitos com 0 % de ovo.

Duas bateladas distintas foram preparadas de cada formulação. O processo de assamento seguiu um delineamento fatorial completo envolvendo os fatores tempo e temperatura de assamento, nos níveis 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos e 150; 180 e 210 °C, respectivamente. A escolha das condições dessa etapa foi baseada em faixas descritas na literatura para assamento de biscoito semidoce (DIMITRIADIS, 2001; MANLEY, 2001; SANTOS et al., 2010; OKPALA & OKOLI, 2012). A formulação 0 % de ovo 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.

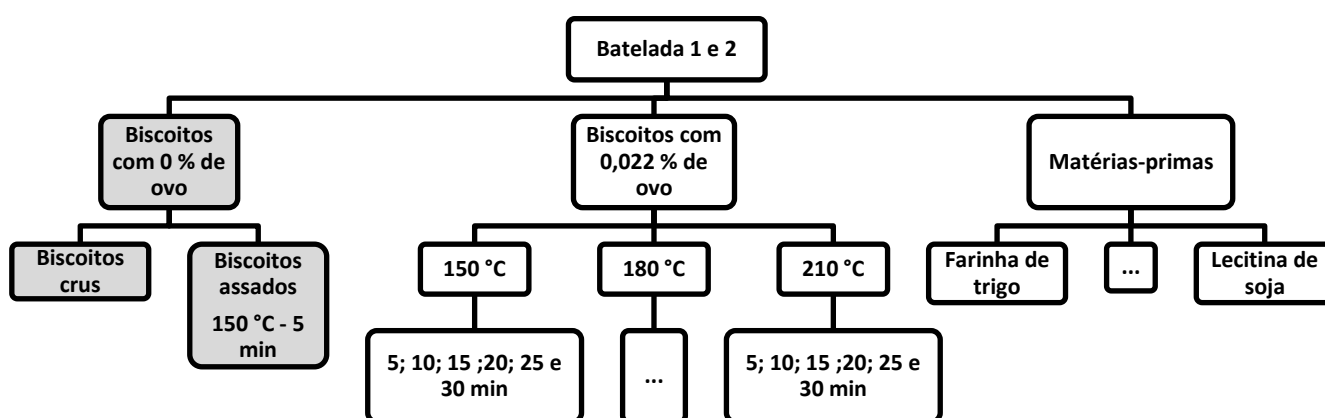
Em cada batelada foram produzidos 2700 g da formulação de biscoito semidoce com 0,022 % de ovo e 300 g da formulação com 0 % de ovo,



separadamente, os quais resultaram, 180 e 20 biscoitos, respectivamente. Destes, foram tomados, aleatoriamente, 10 biscoitos que foram distribuídos entre os diferentes tratamentos.

A análise das proteínas da clara ovoalbumina e ovomucoide foi feita empregando o kit de ELISA Kit RIDASCREEN®FAST Ei/Egg Protein, em duplicata, para cada tratamento de cada batelada.

**Figura 6.** Representação esquemática de delineamento experimental para avaliação da degradação da proteína do ovo em biscoito semidoce, sob diferentes condições de assamento



#### 4.5.2 Análise estatística

Os resultados deste experimento fatorial foram analisados pelo teste de Ryan-Jonier para verificar o ajuste à distribuição normal e, posteriormente, foi realizada análise de variância (ANOVA) e os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey, com nível de significância  $\alpha = 0,05$  (PIMENTEL-GOMES, 2009). Para auxiliar nos cálculos e procedimentos estatísticos foram utilizados os softwares Microsoft Excel 2007®, Minitab®.

## 4.6 Validação

### 4.6.1 Delineamento experimental

Foram elaborados biscoitos semidoces com 0 % de ovo, em três bateladas distintas de cerca de 27 biscoitos, os quais foram assados por 25 minutos a 180 °C (condição mais próxima da ideal para biscoitos semidoces), triturados, homogeneizados e acondicionados em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade de 100 g. Cem alíquotas de 1 g biscoito foram tomadas de cada uma das duas primeiras bateladas e foram adicionadas de solução padrão de OVA, em nove níveis de concentração, além do branco, de forma que foram elaboradas dez replicatas independentes de cada nível. Para a escolha desses níveis foi levado em conta a faixa de trabalho do kit. As análises das replicatas de cada uma destas duas primeiras bateladas, pelo kit, foram realizadas em baterias analíticas distintas, envolvendo diferentes dias e analistas, no mesmo laboratório, simulando condições de precisão intermediária (EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2007) (**Tabela 3**).

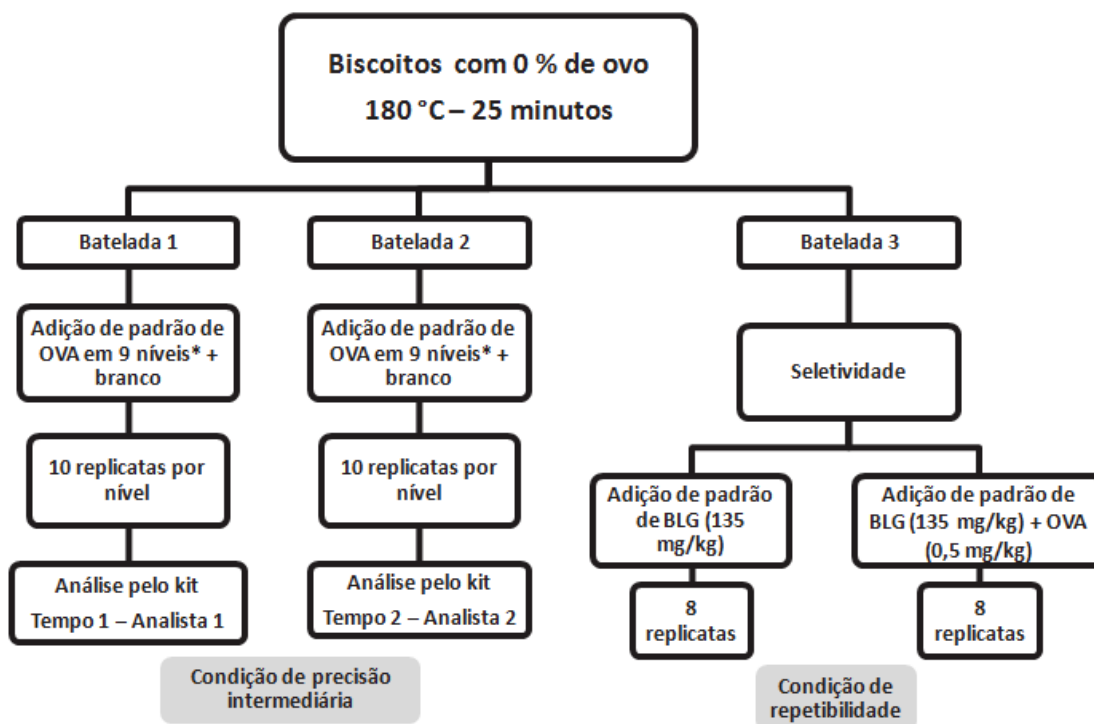
A terceira batelada foi utilizada para o estudo de seletividade. Nessa etapa, oito replicatas de amostras de biscoito foram adicionadas de solução padrão de betalactoglobulina (BLG), como interferente, enquanto outras oito replicatas de amostras foram adicionadas de solução padrão de ovoalbumina na concentração 0,5 mg/kg (menor concentração onde foram obtidos 100 % de resultados positivos) e de BLG. A concentração do interferente utilizada foi de 135 mg/kg, o que correspondeu a um valor dez vezes maior que o último ponto da curva do kit. As replicatas desta terceira batelada foram analisadas pelo kit, por um dos analistas, sob condições de repetibilidade (**Figura 7**).

**Tabela 3.** Níveis de concentração de ovoalbumina avaliados no estudo de validação

Níveis	Concentração final de ovoalbumina (mg/kg)	Volume solução de intermediária adicionado (µL)	Volume de tampão adicionado na extração (µL)
N <sub>0</sub>	0	0	20000
N <sub>1</sub>	0,125	12,5	19987,5
N <sub>2</sub>	0,185	18,5	19981,5
N <sub>3</sub>	0,25	25	19975
N <sub>4</sub>	0,5	50	19950
N <sub>5</sub>	1,0	100	19900
N <sub>6</sub>	3,0	300	19700
N <sub>7</sub>	4,5	450	19550
N <sub>8</sub>	9	900	19100
N <sub>9</sub>	13,5	1350	18650

Solução de trabalho: 10 µg/mL de ovoalbumina.

**Figura 7.** Representação esquemática de delineamento experimental da validação do kit RIDASCREEN®FAST Ei/Egg Protein (Art. No. R6402)



(\*) Concentrações de proteína do ovo: 0; 0,125; 0,185; 0,25; 0,5; 1; 3,0; 4,5; 9,0; e 13,5 mg/kg

#### 4.6.2 Reagentes, padrões e soluções

##### 4.6.2.1 *Solução estoque (1 mg/mL)*

A solução estoque foi composta por 25 mg de padrão de OVA que foram dissolvidos com água ultrapura para balão de 25 mL.

##### 4.6.2.2 *Solução intermediária (10 µg/mL)*

A solução intermediária foi produzida a partir de 500 µL da solução estoque, que foram diluídos para 50 mL de água ultrapura.

#### 4.6.3 Análise estatística

Os softwares Microsoft Excel 2007®, Minitab® e Datafit® foram utilizados nos cálculos e procedimentos estatísticos.

##### 4.6.3.1 *Abordagem quantitativa*

As porcentagens de recuperação foram estimadas para cada nível de concentração estudado, após tratamento de *outliers* pelo teste de Grubbs, conforme descrito por SOUZA *et al.* (2007). Os valores de referência para avaliação dos resultados foram aqueles preconizados pela EC (2002), ou seja foram satisfatórios quando estavam entre 80 e 110 %

Para cada nível de concentração estudado, foram estimados os desvios padrão relativos sob condições de repetibilidade ( $DPR_r$ ) e de precisão intermediária ( $DPR_R$ ), utilizando ANOVA e, as premissas normalidade e homoscedasticidade foram verificadas, previamente, pelos testes de Ryan-Joiner e de Brown-Forsythe, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2007). Quando os  $DPR_r$  foram menores ou iguais a um terço dos desvios calculados pelos modelos de Horwitz, foram considerados aceitáveis. Já para  $DPR_R$  para serem considerados aceitáveis teriam que ser menores ou iguais aos desvios dos modelos citados (EC, 2002).

O limite de detecção foi calculado como sendo igual à média das leituras das amostras brancas somado de três vezes o desvio padrão da média desses ensaios. O limite de quantificação foi calculado como sendo igual à média das determinações da matriz branca somada de 10 vezes o desvio padrão desta média. Os resultados obtidos para amostras brancas foram empregados para avaliação da seletividade (EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2007).

#### 4.6.3.2 *Abordagem qualitativa*

As amostras que puderam ser quantificadas pelo kit foram consideradas positivas, já as amostras que após leitura tiveram o resultado final < 0,5 mg/kg foram consideradas negativas. Tabelas de contingência foram utilizadas para os cálculos das taxas de falsos resultados, TST, TSB e TCF, para os níveis estudados, conforme Gondim *et al.* (2014). Para a estimativa da ACO e CON, dos níveis de concentração trabalhados, utilizou-se análise combinatória. Quando os resultados de ACO foram  $\geq 0,8$  fora da RPC, o método foi considerado suficientemente padronizado (GONDIM *et al.*, 2014).

Para o estudo da RPC foi utilizado o modelo não linear logito, no qual foram plotadas curvas de desempenho da porcentagem de resultados positivos *versus* concentração de OVA em mg/kg. O limite de detecção correspondeu ao limite superior da RPC, sendo que esta foi representada pela região entre 5 e 95 % de resultados positivos, que correspondeu também ao intervalo entre 95 e 5 % de resultados falso-negativos. Considerou-se como aceitável o LD que cobrisse as concentrações de interesse ou regulamentadas. Na avaliação do modelo foram considerados o perfil não tendencioso do gráfico de resíduos e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (GONDIM *et al.*, 2014).

No estudo de seletividade complementar foram considerados alterações nas TCF no nível zero e no menor nível de OVA onde se obteve 100 % na TCF, na presença da proteína interferente BLG. Como critério para considerar o método seletivo, a TCF não pode ter sido alterada na presença do interferente (GONDIM *et al.*, 2014).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo de degradação de proteínas da clara do ovo em biscoitos semi doces

Nas matérias-primas e nas amostras analisadas com 0 % de ovo, cruas e assadas a 150 °C por 5 minutos, não foram detectadas, pelo kit, proteínas da clara do ovo. Isso indicou que não houve contaminação durante o preparo dos biscoitos e nem ao longo das etapas de análise.

Para a estimativa do perfil do decaimento dos teores de proteínas da clara do ovo, os valores foram relacionados ao teor quantificado para o tempo de 5 minutos de assamento na temperatura de 150°C, ou seja, a condição mais branda.

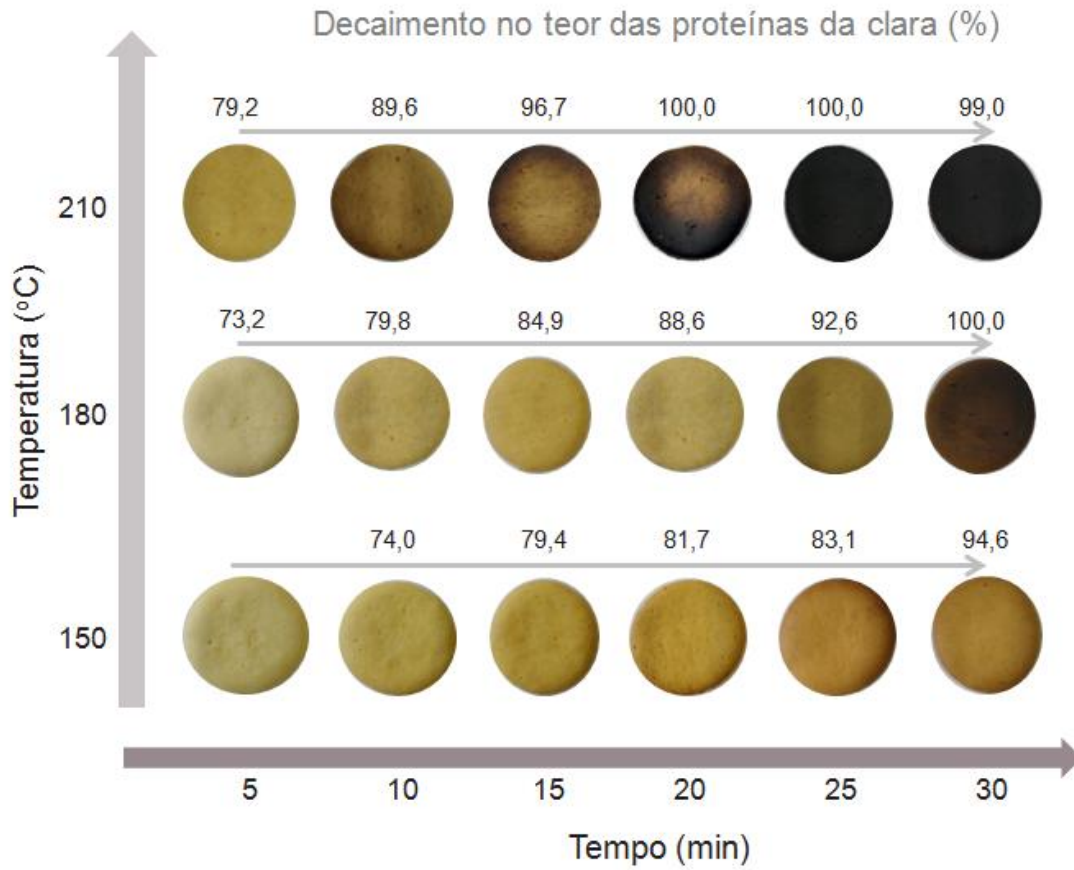
Na temperatura de 150 °C a partir de 10 minutos de assamento, houve queda de 74,0 % no teor de proteínas. Os decaimentos dos teores de proteínas observados nos biscoitos assados por 15, 20 e 25 foram próximos, com redução de 79,4 %; 81,7 %; e 83,1%, respectivamente. Entretanto, com 30 minutos de assamento, a queda foi mais elevada sendo de 94,6 %

Na análise dos biscoitos assados a 180 °C, a queda do teor de proteínas a 5 minutos foi considerável, sendo estimada em 73,2 %. Ao longo dos demais tempos de assamento o decaimento das proteínas foi aumentando até que não foi possível detectar proteínas da clara do ovo em 30 minutos de assamento. As reduções encontradas foram de 79,8 %; 84,9 %; 88,6 %; 92,6 % e 100 % nos tempos de assamento 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, respectivamente.

Nos biscoitos assados na temperatura de 210 °C ainda foi possível detectar proteínas da clara do ovo, porém houve uma queda acentuada nos teores a partir de 20 minutos de assamento. Os percentuais nas quedas dos teores de proteínas observados foram de 79,2 %; 89,6 %; 96,7 %; 100,00 %; 100,00 % e 99,0%, nos tempos de assamento 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, respectivamente (**Figura 8**).

Desta forma, na temperatura de 180 °C com 30 minutos de assamento e na temperatura de 210 °C acima de 20 minutos de assamento, não houve detecção de OVA pelo kit de ELISA, fundamentado em ligação antígeno-anticorpo, indicando uma redução total do potencial antigênico desta proteína.

**Figura 8.** Decaimento no teor de proteínas da clara e seus respectivos percentuais sob diferentes condições de temperatura e tempo de assamento



Pela realização do teste de ANOVA, foi possível observar que houve influência significativa ( $p < 0,05$ ) dos fatores tempo, temperatura e da interação temperatura x tempo nos teores de OVA (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Quadro ANOVA para o estudo fatorial 6 x 3

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	p	Significância
Bloco	1	0,01	0,01	0,1	0,7	p>0,05
Tempo	5	153,7	30,7	306,5	$5,1 \times 10^{-16}$	p<0,001
Temperatura	2	73,7	36,8	366,1	$1,1 \times 10^{-14}$	p<0,001
Temperatura e Tempo	10	90,5	9,0	89,9	0,0	p<0,001
Tratamento	17	317,8				
Resíduo	17	1,7	0,1			
Total	35	319,5				

F: estatística F calculada; p: significância.

O teste de Tukey foi utilizado para que fosse feita a discriminação dos diferentes tratamentos estudados. Considerando a condição de assamento a 150 °C, houve uma redução considerável na detecção das proteínas com 10 minutos de assamento, que diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) dos biscoitos assados a 5 minutos. Os tempos de assamento 15 e 20 minutos não tiveram uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre si e nem em relação aos tempos de 10 e 25 minutos, mesmo com a queda do teor de proteínas no decorrer do tempo. Porém, houve diferença em relação aos biscoitos assados durante 5 minutos. Os biscoitos assados por 25 minutos diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) dos assados a 5 e 10 minutos. Houve diferença significativa da condição de assamento a 30 minutos em relação às demais condições ( $p < 0,05$ ) (**Figura 9**).

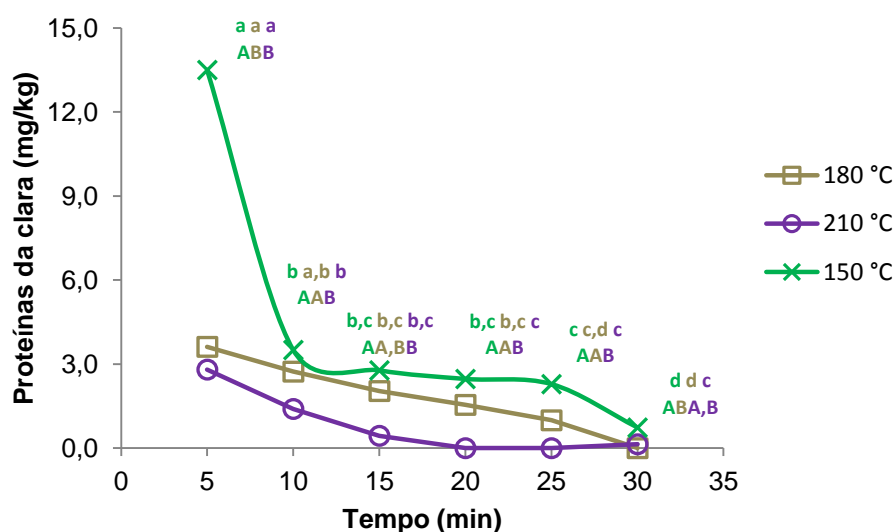
Para a temperatura de 180 °C, os teores de proteínas da clara do ovo encontrados não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) nos tempos 5 e 10 minutos. Os tempos de assamento 15 e 20 minutos não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ), entre si, e dos tempos 10 e 25 minutos, entretanto esse último diferiu ( $p < 0,05$ ) dos tempos 5 e 10 minutos. Os biscoitos assados durante 30 minutos diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais tempos de assamento, com exceção dos biscoitos assados a 25 °C ( $p > 0,05$ ) (**Figura 9**).



Nos biscoitos assados a 210 °C, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os biscoitos assados por 5 e 10 minutos. No tempo de 15 minutos o teor de proteínas não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) dos tempos de assamento 10, 20, 25 e 30 minutos, apesar de ter diferido ( $p < 0,05$ ) em relação a 5 minutos de assamento. Os tempos de assamento 20, 25 e 30 minutos não diferiram significativamente entre si ( $p > 0,05$ ) (**Figura 9**).

As diferentes temperaturas utilizadas, em um determinado tempo de assamento, foram avaliadas, pela comparação das médias estimadas. No tempo de 5 minutos a temperatura de 150 °C diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) das demais temperaturas, porém as temperaturas 180 °C e 210 °C não diferiram entre si. Nos tempos 10, 20 e 25, uma mesma tendência foi observada, apesar da temperatura de 150 °C ter diferido significativamente ( $p < 0,05$ ) da de 210 °C, a temperatura de 180 °C não diferiu das demais ( $p > 0,05$ ). Nos biscoitos assados a 15 minutos, a temperatura de 150 °C diferiu significativamente da de 210 °C ( $p < 0,05$ ), porém a temperatura de 180 °C não teve diferença significativa em relação às outras ( $p > 0,05$ ). No tempo de 30 minutos, houve diferença significativa entre as temperaturas 150° C e 180° C ( $p < 0,05$ ) e a temperatura de 210° C não diferiu das demais ( $p > 0,05$ ) (**Figura 9**).

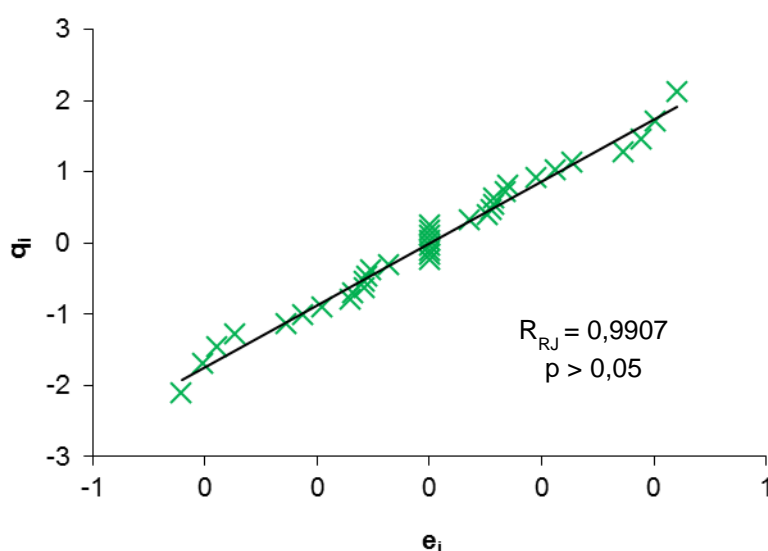
**Figura 9.** Perfil de decaimento do teor de proteínas da clara em função das condições de assamento estudadas com deineamento fatorial completo 6 x 3



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.

Com a aplicação do teste de normalidade verificou-se que os dados obtidos, considerando as diferentes condições de temperatura e tempo utilizados, empregadas no delineamento fatorial 6x3, seguiram a distribuição normal. O coeficiente de correlação de Ryan-Joiner ( $R_{RJ}$ ) obtido foi de 0,9907 ( $p > 0,05$ ) (**Figura 10**).

**Figura 10.** Gráfico de probabilidade da normal (Q-Q Plot) para os resultados obtidos no estudo de degradação de proteínas da clara do ovo em biscoitos semidoces.



Bugyi *et al.*, (2010) investigaram o efeito do processamento na performance de métodos analíticos, utilizando uma matriz alimentar incorporada com leite e ovo. Foram preparados cookies a base de farinha de trigo contendo dois diferentes alergênicos em duas diferentes concentrações: leite em pó (0 e 100 mg/kg) e ovo em pó (0 e 1000 mg/kg). Para a avaliação das proteínas do ovo, foi utilizado o kit de ELISA RIDASCREEN Fast Ei/Egg da R-Biopharm®. Amostras das três etapas de processamento foram analisadas: mistura dos ingredientes, massa crua e cookies (assados sob uma única condição a 180 °C por 16 minutos). Primeiramente, foi constatado que não havia contaminação dos ingredientes utilizados. Foi verificado que a

recuperação média de proteínas da clara do ovo encontrada na mistura dos ingredientes foi de 78,57 %, já no cookie assado o valor encontrado foi de 2,17 %. Apesar de o estudo ter utilizado apenas um tempo e temperatura de assamento e a concentração utilizada ter sido superior àquela avaliada no presente estudo, a queda nos percentuais das proteínas foi similar à aqui reportada, chegando próximo de zero.

Khuda *et al.*, (2012) realizaram um estudo para avaliar parâmetros de kits comerciais de ELISA na análise de biscoitos com açúcar e também o efeito do processamento. Foram produzidos biscoitos com açúcar incorporados com MRC de ovo em pó, obtendo concentrações de 0; 2,5; 5; 10; 25; 100 e 500 mg/Kg. Foram analisadas a massa crua e os biscoitos (assados sob duas condições a 190 °C por 25 e 30 minutos), sendo utilizadas na análise 4 alíquotas de cada amostra. Foram estimados a acurácia, precisão, variância e coeficiente de variação. Em todos os níveis estudados, foi observada queda no percentual de recuperação para todos os kits estudados, e nos biscoitos assados por 30 minutos nenhum dos kits foi capaz de detectar proteínas do ovo. Um dos kits utilizados no estudo foi o RIDASCREEN Fast Ei/Egg da R-Biopharm® e para esse as quedas na recuperação foram de aproximadamente 83 % e 100 % nos biscoitos assados por 25 e 30 minutos, respectivamente.

Ao compararmos as quedas nas recuperações para a temperatura e tempo estudadas no estudo de Khuda *et al.*, (2012), com o presente estudo, levando-se em conta que o mesmo kit foi utilizado, os resultados concordam entre si, visto que não foi possível a detecção de proteínas da clara do ovo em ambos os casos.

Gomma e Boye (2013) investigaram os efeitos do assamento, temperatura e tamanho da matriz, na detecção de proteínas do ovo em biscoitos, sem glúten, utilizando kits de ELISA. As amostras foram assadas sob três condições (177 °C por 10, 15 e 25 minutos) e a concentração final de proteínas foi de 1000 mg/kg. A análise estatística foi feita por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, com nível de significância de 0,05. Com os kits utilizados (Veratox® e Morinaga®), foi observada queda na recuperação das proteínas do ovo nos biscoitos assados. Sendo que nos biscoitos de menor tamanho, não foi possível detectar as proteínas nos biscoitos assados por 15 e 25 minutos. Os kits utilizados no estudo não foram

os mesmos do presente estudo, porém também foi observado um decaimento considerável no teor de proteínas.

No estudo de Gomma e Boye (2013), já não foi possível a detecção nos biscoitos de menor tamanho assados por 15 minutos a 177 °C. Isso pode ter ocorrido devido às dimensões do biscoito, uma vez que não foram informadas no trabalho.

Torok *et al.* (2014) analisaram os efeitos do processamento em biscoitos assados contendo proteínas alergênicas (leite, soja e ovo) individualmente ou contendo múltiplas proteínas de forma simultânea. Os biscoitos foram assados sob uma única condição (180 °C por 16 minutos) e a concentração de proteínas do ovo presente na massa foi de 50 mg/kg. Foram analisadas a mistura dos ingredientes, a massa crua e os biscoitos assados, utilizando kits de ELISA (R-Biopharm<sup>®</sup> e Romerlabs<sup>®</sup>), e os dados foram avaliados pela investigação das médias, desvio padrão e testes de significância (testes de *F* e *t*). Nas etapas de processamento, foi observada uma queda no teor de proteínas na massa crua em relação à mistura dos ingredientes, porém essa queda não foi significativa. Já no biscoito assado não foi possível detectar proteínas da clara do ovo com nenhum dos kits utilizados. Nesse estudo, em uma condição mais branda e com uma maior concentração de ovo na amostra que do presente estudo, a queda no teor de proteínas da clara foi superior, isso pode ter ocorrido devido às diferenças das matrizes e das etapas de preparo dos biscoitos entre os estudos.

Os resultados dos estudos de degradação de proteínas do ovo reportados na literatura corroboram com os achados do presente trabalho. Contudo, vale a pena destacar que nenhum dos trabalhos avaliou a degradação proteica sob diversas condições de tempo e temperatura, combinadas num delineamento fatorial. Ainda, em todos os casos os níveis de concentração proteica foram superiores ao aqui investigado. Desta forma, a influência do tratamento térmico na detecção da OVA e em sua antigenicidade pode ser considerada significativa, principalmente quando empregadas temperaturas de assamento de 180 e 210 °C.

## 5.2 Validação

### 5.2.1 Abordagem quantitativa

Os resultados reportados como não detectados foram expressos como zero. Já aqueles reportados como maiores que 13,5 mg/kg foram expressos como 13,5 mg/kg, para efeito da estimativa da veracidade e precisão.

Nas replicatas onde não foi feita a adição de OVA, foram obtidos resultados não detectados, o que indica que foi demonstrada seletividade do kit nessa abordagem.

Nos níveis de concentração 0,185 e 9 mg/kg foram detectados dois outliers em cada um deles, pela aplicação do teste de Grubbs. As recuperações médias variaram de 0 a 360,5 % entre os níveis estudados (**Tabela 5**).

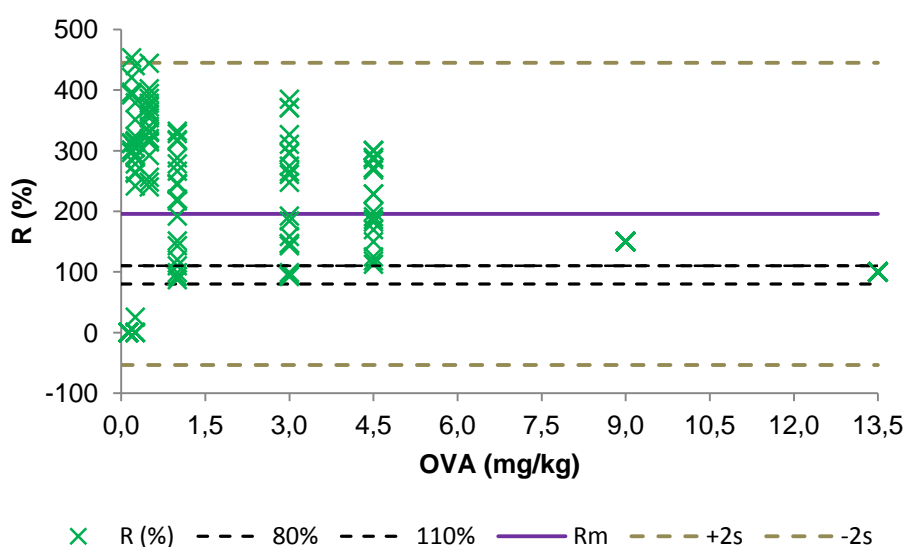
Recuperações médias satisfatórias somente foram evidenciadas para o nível 13,5 mg/kg de OVA, tendo como referência o critério da EC (EC, 2002), que estabelece como aceitáveis recuperações entre 80 e 110 %. DPRr e DPPR inferiores aos limites dos máximos estimados foram observados nos níveis 0,125; 9,0 e 13,5 mg/kg. No nível 0,5 mg/kg, DPPR aceitável também foi alcançado. Todavia, somente no nível 13,5 mg/kg a veracidade e precisão foram demonstradas, simultaneamente, indicando que o kit validado não seria adequado para a quantificação de OVA (**Tabela 5 e Figura 11**).

**Tabela 5.** Número de observações, médias de recuperação e desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, obtidos nos estudos de veracidade e precisão do kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®) para determinação de ovoalbumina em biscoito semidoce

	Ovalbumina (mg/kg)									
	0,125	0,185	0,25	0,50	1,0	3,0	4,5	9,0	13,5	
<i>Tratamento de outliers</i>										
<b>n</b>	20	8	20	20	20	20	20	18	20	
<i>Premissas</i>										
<b>R<sub>RJ</sub></b>	NC	0,940	0,955	0,983	0,970	0,946*	0,963	NC	NC	
<b>F<sub>L</sub></b>	NC	-	4,0	3,2	1,2	2,2	1,7x10 <sup>-2</sup>	NC	NC	
<i>Veracidade</i>										
<b>R<sub>m</sub> (%)</b>	0,0	360,5	235,5	338,6	214,6	233,0	223,1	150,0	100,0	
<b>R<sub>m</sub> Aceit (%)</b>				80 a 110						
<i>Precisão</i>										
<b>DPR<sub>r</sub> (%)</b>	0,0	17,13	60,5	15,6	40,6	41,1	30,0	0,0	0,0	
<b>DPR<sub>r</sub> Máx (%)</b>	14,6	13,8	13,1	11,8	10,7	9,0	8,5	7,7	7,2	
<b>DPR<sub>R</sub> (%)</b>	0,0	-	61,0	15,6	40,6	41,7	30,0	0,0	0,0	
<b>DPR<sub>R</sub> Máx (%)</b>	21,9	20,6	19,7	17,8	16,0	13,6	12,8	11,5	10,8	

n: número de observações após tratamento de *outliers* pelo teste de Grubbs; R<sub>RJ</sub>: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner do teste de normalidade ( $p > 0,05$ ); F<sub>L</sub>: estatística F de Levene do teste de homoscedasticidade ( $p > 0,05$ ); R<sub>m</sub>: porcentagem de recuperação média; R<sub>m</sub> Aceit: critério de aceitabilidade para recuperações médias (Yman *et al.*, 1994); DPR<sub>r</sub>: desvio padrão relativo sob condições de repetibilidade; DPR<sub>r</sub> Máx: desvio padrão relativo de repetibilidade máximo (Yman *et al.*, 1994); DPR<sub>R</sub>: desvio padrão relativo sob condições de precisão intermediária; DPR<sub>R</sub> Máx: desvio padrão relativo de precisão intermediária máximo (Yman *et al.*, 1994); NC: não calculado porque todos os resíduos foram estimados como zero.  
Destacado em cinza dados que atenderam aos critérios de aceitabilidade definidos.

**Figura 11.** Porcentagens de recuperação individuais (R), recuperação média (R<sub>m</sub>), desvio padrão (s) obtidos nos estudos de veracidade e precisão do kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®) para determinação de ovoalbumina em biscoito semidoce.



Em um estudo interlaboratorial realizado no Japão para avaliar o desempenho de kits de ELISA, com o intuito de utilizá-los no monitoramento de alimentos contendo alergênicos, pelo governo japonês, foram utilizadas seis matrizes alimentares adicionadas dos cinco principais ingredientes alergênicos (ovo em pó, leite, trigo, trigo-sarraceno e amendoim). O estudo teve 10 laboratórios participantes, os kits utilizados foram: FASPEK e FASTKIT, uma única concentração de ovo em pó (10 mg/kg) foi utilizada e as análises foram realizadas em duplicata. Para o kit FASPEK a porcentagem de recuperação para proteínas do ovo variou entre 52 a 87 % a  $DPP_R$  de 8 a 17 % e a  $DPR_r$  de 4 a 5 % , com o kit FASTKIT as variações de recuperação,  $DPP_R$  e  $DPR_r$  foram de 66 a 98 %; 6 a 15 % e 2 a 5 %, respectivamente. Assim como no presente estudo, as porcentagens de recuperação não estiveram na faixa adequada, apesar de os valores terem sido inferiores. É importante deixar claro que, embora houve a participação de vários laboratórios, somente foi estudada uma concentração de alérgeno e não houve a utilização de um padrão de proteínas do ovo, mas sim de uma matéria-prima submetida a processamento térmico, o que pode ter impactado a avaliação da veracidade (MATSUDA et al., 2006).

Em um estudo intralaboratorial, foram avaliados quatro kits de ELISA: Veratox para análise de ovo (Neogen Corp<sup>®</sup>), RIDASCREEN Fast Ei/Egg para análise das proteínas da clara do ovo (R-Biopharm<sup>®</sup>), BLOKIT para detecção de proteínas da clara (Tepnel<sup>®</sup>) e o kit para proteínas do ovo da Morinaga<sup>®</sup>. Amostras de farinha de trigo foram incorporadas de material de referência para ovo em pó (RM 8445) de forma a obter uma faixa de concentração que estivesse nas faixas de detecção dos kits estudados. As concentrações utilizadas incluíram 0,6; 1,9; 5,6; 16,5 e 50 mg/kg de ovo em pó, as quais foram estudadas em duplicata. No maior nível de concentração estudado, todos os kits obtiveram resultados superiores aos limites superiores de quantificação e para o menor nível nenhum dos kits conseguiu detectar o alérgeno. Com o kit da R-Biopharm<sup>®</sup> foram obtidas recuperações de 158,9 e 131,6 % para as concentrações 5,6 e 1,9 mg/kg, respectivamente. Para o referido kit, na concentração de 16,5 mg/kg, o valor obtido foi superior ao último ponto da curva (DIAZ-AMIGO, 2010).

Embora os resultados de recuperação reportados por Diaz-Amigo (2010) tenham sido inferiores aos evidenciados no presente estudo, os mesmos

também se encontravam fora da faixa considerada aceitável. Cumpre destacar, ainda, o número restrito de replicatas de amostras avaliado em cada nível de concentração, o fato de se ter adotado um material de referência de ovo processado e não de proteína, assim como a menor complexidade da matriz empregada. Cabe salientar, ainda, que o kit o da R-Biopharm<sup>®</sup> utilizado é específico para OVA, ovomucoide, lisozima e ovotransferrina, ou seja, possui uma diferente especificidade em relação ao utilizado no presente estudo, além de um limite de detecção diferente.

Tomková et al. (2010) realizaram um estudo interlaboratorial para validar um kit de ELISA (Egg ELISA Kit-Native, SEDIUM<sup>®</sup>) específico para proteínas da clara do ovo. Participaram do estudo 11 laboratórios e foram analisadas 16 tipos de alimentos que continham e não continham ovo como ingrediente. Adicionalmente, quatro amostras livres de ovo foram adicionadas de padrão de proteínas da clara do ovo, em duas concentrações (5 e 10 mg/kg), as quais foram analisadas em duplicata. Nessas amostras onde foram adicionadas proteínas a porcentagem de recuperação variou de 93,4 a 124,9 %. A DPP<sub>R</sub> e DPR<sub>r</sub> variaram de 16,5 a 35,2 % e de 10,2 a 23,9 %, respectivamente. Os valores obtidos pelos autores estiveram mais próximos das faixas de aceitabilidade do que os evidenciados no presente estudo.

Cagnasso et al. (2014) avaliaram o kit de ELISA RIDASCREEN Fast Ei/Egg da R-Biopharm<sup>®</sup> na detecção de proteínas do ovo em produtos comerciais para o preparo de cremes, biscoitos, massas, tortas, pizzas, nhoques e suplementos infantis. Foram analisadas 13 amostras, das quais seis estiveram dentro da faixa de quantificação do kit (0,5 a 13,5 mg/kg), cinco apresentaram valores menores que o limite de quantificação (0,5 mg/kg) e duas tiveram resultados acima o último ponto da curva de quantificação (13,5 mg/kg). Apesar de os autores não terem avaliado parâmetros de desempenho de validação, eles propuseram que o kit é adequado em situações onde os teores de alergênicos são baixos, como em casos de contaminação cruzada.

Johnson et al. (2014) realizaram um estudo do desempenho de diferentes kits, envolvendo diversos laboratórios, para uma matriz de sobremesa incorporada de clara de ovo pasteurizada ou leite em pó desnatado. As amostras que continham proteínas da clara do ovo estavam nas seguintes



concentrações: 0, 3, 6, 15 ou 30 mg/kg. Foram utilizados kits de ELISA Enhanced egg ESEGG-48 (ELISA systems<sup>®</sup>), 8450 – Veratox para ovo (Neogen<sup>®</sup>), Egg ovalbumin (Morinaga<sup>®</sup>), RIDASCREEN FAST Ei/egg R6402 (R-Biopharm<sup>®</sup>), AgraQuant egg white assay COKAL0848 (Romer<sup>®</sup>). Participaram do estudo 17 laboratórios, os quais receberam amostras cegas juntamente com os kits e essas foram analisadas em duplicata. Todos os kits subestimaram a concentração de proteínas nas amostras. Na concentração de 3 mg/kg, as recuperações variaram de 47 a 97 %, enquanto na concentração de 6 mg/kg, a variação foi de 48,0 a 87,8 %. As faixas de recuperação nas concentrações de 15 e 30 mg/kg, foram de 45,2 a 83,4 % e de 42,3 a 84,7 %, respectivamente. Segundo os autores, os kits foram capazes de detectar proteínas alergênicas mesmo em baixas concentrações, neste tipo de matriz (JOHNSON et al, 2014). O trabalho desenvolvido por Johnson et al. (2014) teve como pontos fortes o envolvimento de diferentes laboratórios e kits e um número significativo de replicatas por nível. Contudo, o emprego de clara de ovo processada e não de um padrão de proteína pode impactar significativamente a avaliação da veracidade, dada a variabilidade dos teores proteicos nas matrizes alimentares e à degradação durante o processamento. Vale a pena considerar que o perfil de recuperação relatado pelos pesquisadores foi distinto daquele apresentado no presente estudo, no qual a recuperação não foi satisfatória por superestimar o conteúdo proteico.

Restani et al. (2014) organizaram um estudo colaborativo interlaboratorial para validar um kit comercial de ELISA (Euroclone SpA<sup>®</sup>) para determinação de resíduos de proteínas alergênicas em vinhos. Foram analisadas 12 amostras cegas de vinho contendo proteínas do ovo nas concentrações de 0 a 7 mg/kg e essas foram distribuídas para serem analisadas por 11 laboratórios, em duplicata. A recuperação média obtida no estudo foi de 93,48 %, a DPP<sub>R</sub> variou de 0,32 a 1,58 %. O fato de o vinho ser uma matriz menos complexa que o biscoito, pode ter contribuído para os valores de recuperação e precisão terem sido satisfatórios.

Kato et al. (2015) em um estudo interlaboratorial para a avaliação de um kit de ELISA específico para  $\beta$ -lactoglobulina (AE-Milk Kit) e um para ovoalbumina (AE-Egg Kit), analisaram mingau de arroz, sopa de feijão, suco de laranja, salsicha de porco e sopa de miso, incorporadas com ovo ou leite em

pó. Participaram do estudo 14 laboratórios, os quais realizaram as análises em duplicata. A concentração de ovo em pó nas amostras foi de 10 mg/kg. As médias de recuperação variaram de 61,6 a 89,3 % e as médias da precisão sob condições de reprodutibilidade de 3,7 a 5,7 %. Os kits estudados obtiveram resultados satisfatórios diante dos critérios oficiais do Japão: recuperação entre 50-150% e  $DPP_R \leq 25\%$ . Entretanto, é importante deixar claro que número de níveis foi inferiores aos do presente estudo e não foi utilizado um padrão de proteínas e sim ovo em pó.

Os limites de detecção e quantificação teóricos foram estimados como 0,22 e 0,58 mg/kg de OVA. 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.

Alguns trabalhos citados anteriormente reportaram estimativas de limites de detecção e quantificação. Kato et al. (2015), em um estudo interlaboratorial para validação de kit de ELISA específico para ovoalbumina encontrou valores de limite de detecção e quantificação de 0,2 e 0,6 mg/kg, respectivamente. Os dados obtidos nesse trabalho corroboram com o do presente trabalho, visto as semelhanças dos valores. Já no estudo de Tomková et al (2010), onde realizou-se um estudo interlaboratorial para validação de kit específico para proteínas da clara do ovo, os limites de detecção e quantificação encontrados foram 0,43 e 1,4 mg/kg, respectivamente. Esses valores foram superiores aos do presente trabalho, apesar de o menor ponto da curva especificado pelo kit utilizado tenha sido também de 0,5 mg/kg. É importante destacar que o kit é específico para quatro tipo de proteínas presentes na clara do ovo e que a solução padrão de proteínas utilizada pelos autores continha uma mistura de proteínas da clara.

### 5.2.2 Abordagem qualitativa

Em nenhuma das amostras brancas analisadas foi encontrado resultado positivo para OVA pelo kit, representando, então, 0 % de TFP, 100 % de TST e TCF. No nível de concentração de 0,125 mg/kg, não foi possível a detecção de OVA, portanto foram encontrados 100 % de TFN e 0 % de TSB e TCF. No nível

0,185 mg/kg, a estimativa da TFN foi 10 % e da TSB e TCF foi 90 %. Trabalhando-se com concentração de 0,25 mg/kg, a TFN foi 20 % e foi encontrado 80 % de TSB e TCF. A partir do nível 0,5 mg/kg, os valores de TFN, TSB e TCF foram 0, 100 e 100 %, respectivamente (**Tabela 6**).

Conforme pode ser observado na concentração de 0,5 mg/kg adiante e nas amostras brancas, as taxas de sensibilidade, seletividade e confiabilidade foram satisfatórias. Contudo, nos menores níveis trabalhados, percebeu-se uma queda nas taxas de sensibilidade e confiabilidade, sendo que na concentração de 0,125 mg/kg a TCF atingiu 0 % (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Taxas de falso-negativos, de sensibilidade, de falso-positivos, de seletividade e de confiabilidade estimadas na detecção de ovoalbumina em biscoito semidoce pelo kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®)

Ovoalbumina (mg/kg)	Parâmetro		
	TFN/TFP (%)	TSB/TST (%)	TCF (%)
0	0,0	100,0	100,0
0,125	100,0	0,0	0,0
0,185	10,0	90,0	90,0
0,25	20,0	80,0	80,0
0,5	0,0	100,0	100,0
1,0	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 falso-negativos, para amostras positivas; TFP: taxa de falso-positivos, para amostras negativas; TSB: taxa de sensibilidade, para amostras positivas; TST: taxa de seletividade, para amostras negativas; TCF: taxa de confiabilidade. Destacados em cinza os valores que se encontraram fora da região de perda de confiabilidade.

Os valores de ACO e CON foram estimados para todos os níveis estudados. A variação da ACO foi de 0,5 a 1,0 enquanto a CON variou de 0,7 a 1,0. Nos níveis 0, 0,125 e 0,5 mg/kg em diante, a precisão do método,

seguindo uma abordagem qualitativa, é adequada, devido ao fato de a CON ter atingido o valor máximo, ou seja, igual a 1,0 (**Tabela 7**).

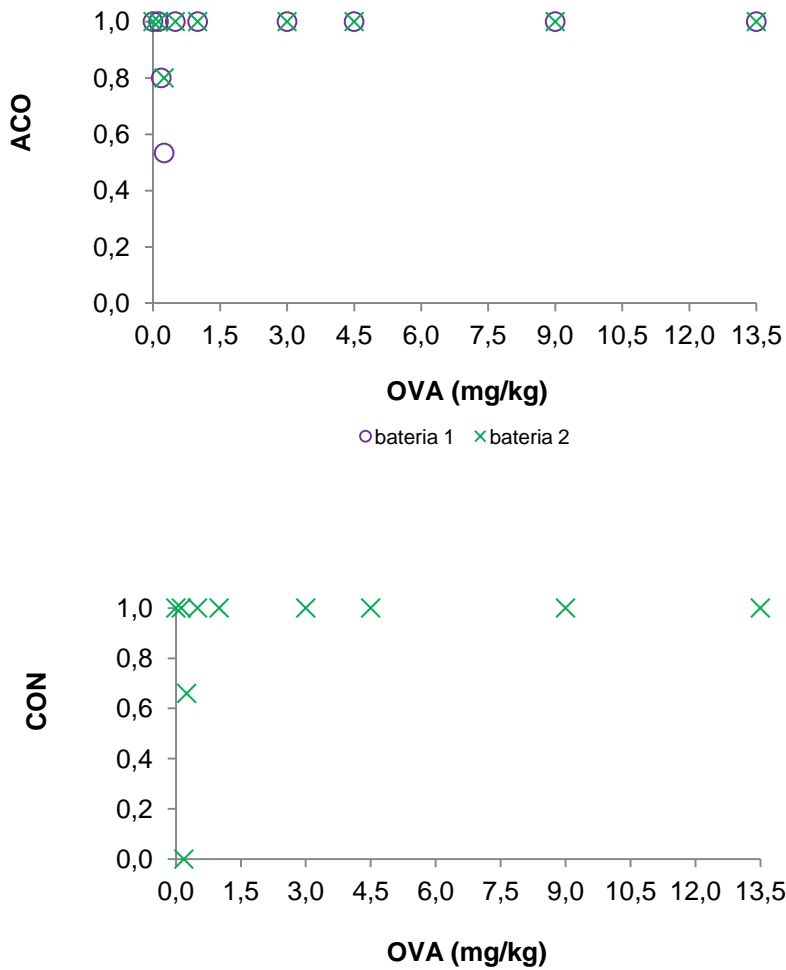
**Tabela 7.** Acordância e concordância estimadas na detecção de ovoalbumina em biscoito semidoce pelo kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®)

Ovoalbumina (mg/kg)	ACO		CON
	Bateria analítica 1	Bateria analítica 2	
0	1,0	1,0	1,0
0,125	1,0	1,0	1,0
0,185	0,8	NC	NC
0,25	0,5	0,8	0,7
0,5	1,0	1,0	1,0
1,0	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; NC: não calculado porque somente foi feita uma bateria analítica para este nível de concentração.  
Destacados em cinza os valores que se encontraram fora da região de perda de confiabilidade.

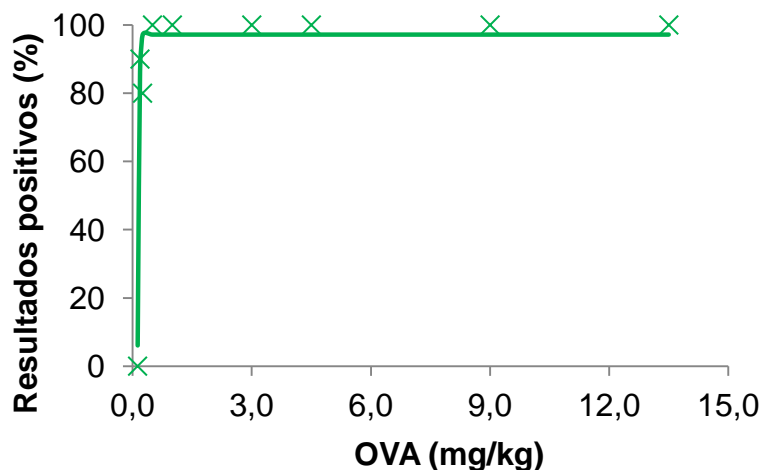
Os gráficos dos valores de ACO e CON, em relação aos níveis de concentração estudados de ovoalbumina, foram construídos e, conforme pode ser verificado na **Figura 12**, os valores de CON, na RPC, possuem um perfil de decaimento adequado.

**Figura 12.** Perfil de resultados de acórdância (ACO) e concordância (CON) como indicadores da precisão do kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®) para determinação de ovoalbumina em biscoito semidoce.



A curva de desempenho do kit foi construída por meio do modelo não linear logito, conforme ilustrado na **Figura 13**.

**Figura 13.** Curva de desempenho construída por meio do modelo não linear logito para o kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®) para determinação de ovoalbumina em biscoito semidoce.

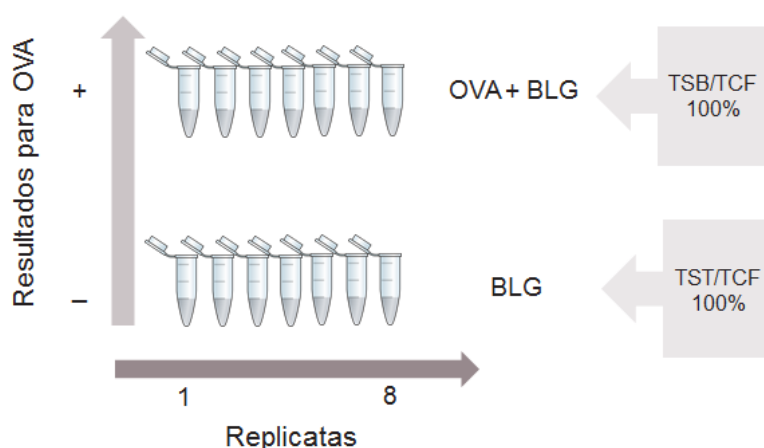


A RPC foi estimada entre 0,1 e 0,2 mg/kg de OVA (relacionados a 5 e 95 % de resultados positivos) e o LD foi representado pelo limite superior desta faixa, o que resultou em um valor superior ao limite reportado pelo fabricante (0,1 mg/kg) e próximo ao estimado na abordagem quantitativa (0,22 mg/kg).

Ao considerar o limite de detecção obtido no estudo qualitativo e levando em conta que em 1 g de biscoito o limite seria 0,0002 mg de OVA, esse valor seria seguro do ponto de vista das faixas limites relatadas na literatura capazes de provocar reações alérgicas, que seria de 0,13 a 200 mg de proteínas do ovo (TAYLOR *et al*, 2002). O Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar do Japão estabeleceu que o limite de detecção para metodologias oficiais de ELISA seria de 0,1 a 1 mg/kg, portanto o valor obtido no presente estudo atende essa especificação (SAKAI *et al.*, 2002).

O kit avaliado apresentou seletividade em relação à proteína BLG visto que mesmo em quantidades significativas as taxas de falso positivos e negativos para OVA não foram alteradas na presença desta segunda proteína alergênica (**Figura 14**).

**Figura 14.** Taxas de sensibilidade, seletividade e confiabilidade obtidas para amostras brancas e adicionadas de ovoalbumina, na presença de betalactoglobulina como potencial interferente, em estudo de seletividade do kit RIDASCREEN Fast Ei/Egg (R-Biopharm®) para determinação de ovoalbumina em biscoito semidoce.



OVA: ovoalbumina; BLG: betalactoglobulina; TCF: taxa de confiabilidade; TSB: taxa de sensibilidade. Critério de aceitabilidade: TCF maior ou igual a 90 %.

Não foram identificados estudos na literatura que investigaram o desempenho de kits de ELISA para a detecção de proteínas alergênicas do ovo, empregando abordagens qualitativas de validação. Vale considerar que as informações qualitativas vem sendo extremamente valorizadas em análises de alimentos, principalmente nos casos nos quais a detecção é suficiente para a tomada de decisão, como no caso dos alérgenos em alimentos, ou mesmo como estratégias de triagem visando a redução do número de análises confirmatórias (GONDIM et al., 2011).

## 6. CONCLUSÃO

Pelo perfil de decaimento no teor de proteínas da clara do ovo evidenciado no estudo de degradação, foi possível perceber que a antigenicidade destas proteínas pode ser reduzida significativamente em função das condições de assamento. Contudo, como em algumas condições avaliadas ainda houve detecção das proteínas da clara, análises de monitoramento se fazem necessárias em biscoitos, empregando métodos capazes de detectar alérgenos em concentrações residuais.

O kit RIDASCREEN® Fast Ei/Egg (R-Biopharm) para detecção de OVA, demonstrou que não atende aos critérios de desempenho para os parâmetros quantitativos, apesar dos limites de detecção e quantificação teóricos encontrados terem sido aceitáveis e próximos aos declarados pelo fabricante.

Os critérios qualitativos foram atendidos pelo kit em na faixa de concentração estabelecida pelo fabricante e o mesmo apresentou seletividade frente à betalactoglobulina como proteína interferente.

Devido ao fato da alergia alimentar oferecer riscos, mesmo em concentrações mínimas, o kit de ELISA validado, com enfoque qualitativo, se mostrou adequado ao propósito de monitoramento de alérgenos do ovo em biscoitos. Entretanto, faz-se necessário que limites aceitáveis sejam estabelecidos pela legislação nacional.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABIN, B. et al. Identification of IgE-Binding Egg White Proteins: Comparison of Results Obtained by Different Methods. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 109, n. 1, p. 50-57, 2004. ISSN 1018-2438.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2008. ISBN 8535222448.

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.

ABIMAPI. Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães e Bolos Industrializados. **Estatísticas de Biscoitos**. 2016. Disponível em: < <http://www.abimapi.com.br/estatistica-biscoito.php>>. Acesso em: 18 fev. 2016

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2016**. São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-aneais>>. Acesso em: 18 out. 2016

AGUILERA, E. et al. Robustness in qualitative analysis: a practical approach. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 621-627, 6// 2006. ISSN 0165-9936. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993606000434>>. Acesso em: 13 nov. 2016

AKIYAMA, H.; IMAI, T.; EBISAWA, M. Japan food allergen labeling regulation--history and evaluation. **Adv Food Nutr Res**, v. 62, p. 139-71, 2011. ISSN 1043-4526 (Print)

ALLEN, K. J.; KOPLIN, J. J. The Epidemiology of IgE-Mediated Food Allergy and Anaphylaxis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 32, n. 1, p. 35-50, 2// 2012. ISSN 0889-8561. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889856111001123> >. Acesso em: 08 nov. 2016.

AOAC. Association of Official analytical Chemists). **AOAC Peer-verified Methods Program. Manual on Polices and Procedures**. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 1998. 35 p.

APPLEGATE, E. Introduction: nutritional and functional roles of eggs in the diet. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. sup5, p. 495S-498S, 2000. ISSN 0731-5724.

AZARNIA, S. et al. Detection of ovalbumin in egg white, whole egg and incurred pasta using LC–ESI-MS/MS and ELISA. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 526-534, 7// 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913001440> >. Acesso em: 11 set. 2015.

BESLER, M. Determination of allergens in foods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 662-672, 11// 2001. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993601001194> >. Acesso em: 28 ago. 2015.

BERND, L. A. et al. Anafilaxia no Brasil: levantamento da ASBAI. **Rev Bras Alergia Imunopatol**, v. 33, p. 190-8, 2010.

BIRT. Baking Industry Research Trust. **Defining Biscuits (& Cookies). Information Sheet**. v 1.0, 2010. Disponível em: < [http://www.bakeinfo.co.nz/files/file/92/birt\\_biscuits\\_&\\_cookies\\_info\\_sheet.pdf](http://www.bakeinfo.co.nz/files/file/92/birt_biscuits_&_cookies_info_sheet.pdf)>. Acesso em: 15 fev. 2016

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Portaria nº 1, de 21 de fevereiro de 1990. Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 06 mar. 1990. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 30 ago. 2016

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC nº 005, de 05 de julho de 1991. Padrão de identidade e qualidade para ovo integral. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 31 jul. 1991. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 09 ago. 2015.

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. 2002.

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. **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. 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. 2015.

BRUCE, B.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. **Mikrochim. Acta**, Acta, v. 128, p. 93-106, 1998.

BUGYI, Z. et al. Towards development of incurred materials for quality assurance purposes in the analysis of food allergens. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, n. 1–2, p. 25-29, 7/5/ 2010. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267010003685> >. Acesso em: 22 mar. 2016

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.

CODEX. **General standard for the labelling of prepackaged foods.** Codex Stan. 2 2010.

CROGUENNEC, T. et al. Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 315, n. 2, p. 627-636, 11/15/ 2007. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979707009812> >.

COSTA, J.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; MAFRA, I. Alergênios Alimentares: O que são, o que provocam e como detetá-los? **Química**, v. 127, p. 33-38, 2012.

CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Analytical features in qualitative analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 477-487, 6// 2005. ISSN 0165-9936. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993605000853> >. Acesso em: 13 nov. 2016

DA SILVA PEREIRA, A. C.; MOURA, S. M.; CONSTANT, P. B. L. Alergia alimentar: sistema imunológico e principais alimentos envolvidos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 189-200, 2008. ISSN 1679-0367.

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

DONATO, D. C. Z. et al. A questão da qualidade no sistema agroindustrial do ovo. SOBER 47º Congresso-Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Porto Alegre, 2009.

EC. European Commission. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002, L 221/8.

ELLISON, S. L. R.; FEARN, T. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 468-476, 6// 2005. ISSN 0165-9936. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993605000865> >. Acesso em: 13 nov. 2016

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. **Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, (2012). 141 p.

EU. European Union. The Commission of the European Communities. Commission Directive 2007/68/EC, of 25 October 2007. Amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients. **Official Journal of the European Union**.

2007. Disponível em: < [https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Dir2007\\_68\(1\).pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Dir2007_68(1).pdf)>. Acesso em: 16 out. 2015

EU. European Union. The Commission of the European Communities. Commission Directive 2011/1169/EC, of 27 November 2007. on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. **Official Journal of the European Union**. 2011. Disponível em: <[https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg1169\\_2011.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg1169_2011.pdf)>. Acesso em: 25 mar. 2016

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington: LGC, 1998. 61 p.

EURACHEM/CITAC. **Quantifying uncertainty in analytical measurements**. Teddington: LGC, 2000. 120 p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT database**. 2016. Disponível em: < [http://faostat3.fao.org/browse/Q/\\*E](http://faostat3.fao.org/browse/Q/*E) >. Acesso em: 02 nov. 2016.

FDA. Allergens - Label Declaration of Allergenic Substances in Foods; Notice to Manufacturers. 1996. Disponível em: < <http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/allergens/ucm106546.htm> >. Acesso em: 22 out. 2015.

FDA. Food and Drug Administration. 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.

GENDEL, S. M. Comparison of international food allergen labeling regulations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 279-285, 7// 2012. ISSN 0273-2300. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230012000797> >. Acesso em: 20 out 2015

GENDEL, S. M. The Regulatory Challenge of Food Allergens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 5634-5637, 2013/06/19 2013. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf302539a> >. Acesso em: 20 out 2015

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 305-309A, 1996.

GITTELSOHN, J. et al. Infant feeding practices reflect antecedent risk of xerophthalmia in Nepali children. **European journal of clinical nutrition**, v. 51, n. 7, p. 484-490, 1997. ISSN 0954-3007.

GOMAA, A.; BOYE, J. I. Impact of thermal processing time and cookie size on the detection of casein, egg, gluten and soy allergens in food. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 483-489, 7// 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913000380> >. Acesso em: 29 mar. 2016

GOMAA, A.; BOYE, J. I. Simultaneous detection of multi-allergens in an incurred food matrix using ELISA, multiplex flow cytometry and liquid chromatography mass spectrometry (LC–MS). **Food Chemistry**, v. 175, p. 585-592, 5/15/ 2015. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614019190> >. Acesso em: 29 mar. 2016

GONDIM, C. D. S. Validação de métodos qualitativos: delineamento de procedimento e aplicação na pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru. **Teses**, 2012.

GONDIM, C. D. S.; JUNQUEIRA, R. G.; SOUZA, S. V. C. Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [S.l.], v. 70, n. 4, p. 433-447, apr. 2011. ISSN 1983-3814. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/5522>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

GONDIM, C. D. S. et al. An appropriate and systematized procedure for validating qualitative methods: its application in the detection of sulfonamide residues in raw milk. **Anal Chim Acta**, v. 830, p. 11-22, Jun 2014. ISSN 1873-4324. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856507> >. Acesso em: 20 mar. 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. e9-e17, 2011. Disponível em: < <http://pediatrics.aappublications.org/content/128/1/e9.abstract> >. Acesso em: 06 set. 2015.

HIDETAKA, N. (2013). **Increase in Thermal Stability of Proteins by Aprotic Ionic Liquids, Ionic Liquids - New Aspects for the Future**, Dr. Jun-ichi Kadokawa (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/51231, 2006. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/ionic-liquids-new-aspects-for-the-future/increase-in-thermal-stability-of-proteins-by-aprotic-ionic-liquids>>. Acesso em: 18 set. 2015

HU, F. B. et al. A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. **JAMA**, v. 281, n. 15, p. 1387-1394, 1999. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/jama.281.15.1387> >. Acesso em: 23 ago. 2015.



HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC Int.**, Feb, p. 96-105, 1998

HUNTINGTON, J. A.; STEIN, P. E. Structure and properties of ovalbumin. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 756, n. 1–2, p. 189-198, 5/25/ 2001. ISSN 0378-4347. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434701001086> >. Acesso em: 16 set. 2015.

IANNOTTI, L. L. et al. Eggs: the uncracked potential for improving maternal and young child nutrition among the world's poor. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 6, p. 355--368, 2014. ISSN 1753-4887. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/nure.12107> >. Acesso em: 25 ago. 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: **Estatística da Produção Pecuária**. 2016. Disponível em: < [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201610.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201610.pdf) >. Acesso em: 04 out. 2016

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of Analytical procedures: methodology**. Geneva: ICH/IFPMA, 1996. 8p.

INMAN, E. L. et al. General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 25, p. 252-256, 1987.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008. Orientações Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2016. 31 p.

IOFI. International Organization of the Flavor Industry. **Information: Update on Food Allergy Labeling in Japan**. 2013. Disponível em: <http://farrp.unl.edu/77c3494f-6568-42f3-b62c-f97d21eb2586.pdf> >. Acesso em: 08 jan. 2017

ISO. International Standards Organization. **International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology - VIM**. Geneva: ISO, 1993. 59 p.

ISO. International Standard Organization. ISO 9000. **Quality Management Systems - Fundamentals and Vocabulary**. Geneva: ISO, 2005. 30 p. (a).

ISO. International Standard Organization. ISO/IEC 17025. **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**. Geneva: ISO, 2005. 28 p. (b).

JACKSON, K. D.; HOWIE, L. D.; AKINBAMI, L. J. Trends in allergic conditions among children: United States, 1997-2011. **NCHS data brief**, v. 121, p. 1-8, 2013.

JOHNSON, P. E. et al. Current Perspectives and Recommendations for the Development of Mass Spectrometry Methods for the Determination of Allergens in Foods. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 4, p. 1026-1033, // 2011. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac/2011/00000094/00000004/art00003> >. Acesso em: 02 out. 2015.

KATO, Y.; OOZAWA, E.; MATSUDA, T. Decrease in Antigenic and Allergenic Potentials of Ovomuroid by Heating in the Presence of Wheat Flour: Dependence on Wheat Variety and Intermolecular Disulfide Bridges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3661-3665, 2001/08/01 2001. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf0102766> >. Acesso em: 15 set. 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, 2009a. ISSN 1757-837X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1757-837X.2009.00009.x> >. Acesso em: 24 set. 2015.

KERKAERT, B.; MESTDAGH, F.; DE MEULENAER, B. Detection of hen's egg white lysozyme in food: Comparison between a sensitive HPLC and a commercial ELISA method. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 580-584, 5/15/2010. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609012205>>. Acesso em: 15 set. 2015.

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, 2012/05/02 2012. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf3001839>>. Acesso em: 21 dez. 2015

KUROWSKI, K.; BOXER, R. W. Food allergies: detection and management. **American Family Physician**, v. 77, n. 12, p. 1678-1686, 2008. ISSN 0002-838X.

LACK, G. Epidemiologic risks for food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 6, p. 1331-1336, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2008.04.032>>. Acesso em: 05 set. 2015.

LANGTON, S. D. et al. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 175-181, 12/15/ 2002. ISSN 0168-1605. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502001071>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

LEE, J. ; KIM, C. J. Determination of Allergenic Egg Proteins in Food by Protein-, Mass Spectrometry-, and DNA-Based Methods. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 2, p. 462-477, // 2010. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac/2010/00000093/00000002/art00013>>. Acesso em: 11 set. 2015.

LEE, S. E.; KIM, H. Update on Early Nutrition and Food Allergy in Children. **Yonsei Med J**, v. 57, n. 3, p. 542-8, May 2016. ISSN 0513-5796. Acesso em: 08 nov. 2016.

LI, Y. et al. Establishment of a Highly Sensitive Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific for Ovomuroid from Hen's Egg White. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 337-342, 2008/01/01 2008. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf0724522> >. Acesso em: 11 set. 2015.

LIU, A. H. et al. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 4, p. 798-806.e14, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2010.07.026> >. Acesso em: 07 set. 2015.

LOPES, C. et al. Allergy School Hannover 2006: Allergy, from diagnosis to treatment. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 14, p. 355-364, 2006.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. **Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods—a laboratory guide to method validation and related topics**. 2014. 70 p.

MAMAT, H.; ABU HARDAN, M. O.; HILL, S. E. Physicochemical properties of commercial semi-sweet biscuit. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1029-1038, 8/15/ 2010. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610001238> >. Acesso em: 20 fev. 2016

MANLEY, D. J. R. **Technology 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.

MARCELINO, J. S.; MARCELINO, M.S.; Dossiê Técnico-Fabricação de Bolachas e Biscoitos. **Instituto de Tecnologia do Paraná**, 2012.

MARTINS, M. T. S.; GALEAZZI, M. A. M. Alergia alimentar: considerações sobre o uso de proteínas modificadas enzimaticamente. **Revista Cadernos de Debate**, p. 1-24, 1996.

MARTORELL ARAGONÉS, A. et al. Allergy to egg proteins. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 29, n. 02, p. 72-83, 2001. ISSN 105. Disponível em: < <http://www.elsevier.es/es-revista-allergologia-et-immunopathologia-105-articulo-allergy-to-egg-proteins-13013610ER> >. Acesso em: 11 set. 2015.

MATTAROZZI, M. et al. Investigation of different sample pre-treatment routes for liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection of caseins and ovalbumin in fortified red wine. **Food Control**, v. 38, p. 82-87, 4// 2014. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513005380> >. Acesso em: 24 set. 2015.

MCGEE, H. **On food and cooking: the science and lore of the kitchen.** Simon and Schuster, 2007. ISBN 1416556370..

MINE, Y.; NOUTOMI, T.; HAGA, N. Thermally induced changes in egg white proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 12, p. 2122-2125, 1990/12/01 1990. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf00102a004> >. Acesso em: 11 set. 2015.

MINE, Y.; YANG, M. Recent Advances in the Understanding of Egg Allergens: Basic, Industrial, and Clinical Perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 4874-4900, 2008/07/01 2008. ISSN 0021-8561.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf8001153> >. Acesso em: 16 set. 2015.

MINE, Y.; ZHANG, J. W. Comparative Studies on Antigenicity and Allergenicity of Native and Denatured Egg White Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2679-2683, 2002/04/01 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf0112264> >. Acesso em: 17 set. 2015.

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, 6// 2010. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224410000646> >. Acesso em: 09 jan. 2017

MOREIRA, L. F. Estudo dos componentes nutricionais e imunológicos na perda de peso em camundongos com alergia alimentar. 2006.

MORISSET, D. A. M. et al. Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 33, n. 8, p. 1046--1051, 2003. ISSN 1365-2222. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01734.x> >. Acesso em: 11 set. 2015.

MUTUNGI, G. et al. Dietary Cholesterol from Eggs Increases Plasma HDL Cholesterol in Overweight Men Consuming a Carbohydrate-Restricted Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 2, p. 272-276, 2008. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/138/2/272.abstract> >. Acesso em: 06 mar. 2017

NAKAMURA, Y. et al. Egg consumption, serum total cholesterol concentrations and coronary heart disease incidence: Japan Public Health Center-based prospective study. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 05, p. 921-928, 2006.

NATA. National Association of Testing Authorities - Australia. **Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods.** Sydney: NATA, 1997. 8p.

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. ISSN 0021-7557.

NWARU, B. I. et al. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. **Allergy**, v. 69, n. 8, p. 992--1007, 2014. ISSN 1398-9995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/all.12423> >. Acesso em: 05 dez. 2015

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.

PATEL, B. Y.; VOLCHECK, G. W. Food Allergy: Common Causes, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 10, p. 1411-1419, 2015. ISSN 0025-6196. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.07.012> >. Acesso em: 05 mai. 2016

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 & Contaminants**, v. 21, n. 1, p. 1-31, 2004/01/01 2004a. ISSN 0265-203X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/02652030310001620423> >. Acesso em: 11 set. 2015.

POULSEN, L. K. et al. Allergens from fish and egg. **Allergy**, v. 56, p. 39-42, 2001. ISSN 1398-9995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.00912.x> >. Acesso em: 15 set. 2015.

PULIDO, A. et al. Uncertainty of results in routine qualitative analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 647-654, 10// 2003. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016599360301104X> >. Acesso em: 08 nov. 2016

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.

R-BIOPHARM. **Procedimento analítico RIDASCREEN®FAST Ei/Egg Protein**. Alemanha, 2011.

RÍOS, A. et al. Quality assurance of qualitative analysis in the framework of the European project 'MEQUALAN'. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 8, n. 2, p. 68-77, 2003// 2003. ISSN 1432-0517. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00769-002-0556-x> >. Acesso em: 13 nov. 2016

RÍOS, A.; TÉLLEZ, H. Reliability of binary analytical responses. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 509-515, 6// 2005. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993605000920> >. Acesso em: 13 nov. 2016

RONG, Y. et al. Egg consumption and risk of coronary heart disease and stroke: dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. **BMJ**, v. 346, 2013. Disponível em: < <http://www.bmj.com/content/346/bmj.e8539.abstract> >. Acesso em: 18 ago. 2015.



RSC. Royal Society of Chemistry. **Analytical Methods Committee Technical Brief: Terminology - the key to understanding the analytical science. Part 1: accuracy, precision and uncertainty.** RSC, 2003. 2p.

RONA, R. J. et al. The prevalence of food allergy: A meta-analysis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 3, p. 638-646, 2007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2007.05.026> >. Acesso em: 06 set. 2015.

SAKAI, S. et al. Validation of quantitative and qualitative methods for detecting allergenic ingredients in processed foods in Japan. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 24, p. 5675-80, Jun 19 2013. ISSN 0021-8561.

SAMPSON, H. A.; MENDELSON, L.; ROSEN, J. P. Fatal and Near-Fatal Anaphylactic Reactions to Food in Children and Adolescents. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 6, p. 380-384, 1992/08/06 1992. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199208063270603> >. Acesso em: 16 set. 2015.

SAMPSON, H. A. Fatal food-induced anaphylaxis. **Allergy**, v. 53, p. 125--130, 1998. ISSN 1398-9995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb04982.x> >. Acesso em: 30 ago. 2015.

SAMPSON, H. A. Update on food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 5, p. 805-819, 5// 2004. ISSN 0091-6749. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674904011455> >. Acesso em: 28 ago. 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.

SCHUBERT-ULLRICH, P. et al. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 1, p. 69-81, 2009/09/01 2009. ISSN 1618-

2642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-2715-y> >. Acesso em: 30 ago. 2015.

SHABIR, G. A. Validation of High-performance Liquid Chromatography Methods for the Pharmaceutical Analysis. Understanding the Differences and Similarities Between Validation Requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and International Conference on Harmonization. **J. Chromatogr. A**, v. 987, p. 57-66, 2003

SHIN, M.; HAN, Y.; AHN, K. The Influence of the Time and Temperature of Heat Treatment on the Allergenicity of Egg White Proteins. **Allergy Asthma Immunol Res**, v. 5, n. 2, p. 96-101, 3/ 2013. ISSN 2092-7355. Disponível em: < <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4168%2Faair.2013.5.2.96> >. Acesso em: 29 mar. 2016.

SICHERER, S. H. Food allergy: when and how to perform oral food challenges. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 10, n. 4, p. 226-34, Nov 1999. ISSN 0905-6157 (Print).

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 2, p. 291-307.e5, 2014. ISSN 0091-6749. Acesso em: 05 out. 2016.

SIMABESP. Sindicato da Indústria de Massas Alimentícias e Biscoitos no Estado de São, **Mercado Biscoitos**, 2016. Disponível em: [http://www.simabesp.org.br/site/mercado\\_biscoitos\\_simabesp.asp](http://www.simabesp.org.br/site/mercado_biscoitos_simabesp.asp). Acesso em: 11 fev. 2016

SOBRINHO, J. K.; FONSECA, R. Análise econômica da produção de ovos de galinhas poedeiras no município de Toledo–PR. **Revista Eletrônica Lato Sensu**, v. 2, n. 1, p. 1-20, 2007. Acesso em: 17 ago. 2015.

SOLE, D. et al. Anaphylaxis in Latin America: a report of the online Latin American survey on anaphylaxis (OLASA). **Clinics**, v. 66, p. 943-947, 2011. ISSN 1807-5932.

SOLÉ, D. et al. Consenso Brasileiro sobre alergia alimentar: 2007. **Rev. bras. alerg. imunopatol**, p. 64, 2002.

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.

SOUZA-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. Aves e ovos. **Pelotas: Editora da Universidade UFPEL**, 2005.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 301-314, 1/28/ 1994. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867494903379> >. Acesso em: 30 ago. 2015.

SUDHA, M. L.; CHETANA, R.; REDDY, S. Y. Effect of microencapsulated fat powders on rheological characteristics of biscuit dough and quality of biscuits. **Journal of Food Science and Technology**, India, v. 51, n. 12, p. 3984-3990, ISSN 0022-1155. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4252416/> >. Acesso em: 20 fev. 2016

SURAI, P. F.; SPARKS, N. H. C. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 1, p. 7-16, 1// 2001. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224401000486> >. Acesso em: 19 ago. 2015.

TANABE, S. Analysis of Food Allergen Structures and Development of Foods for Allergic Patients. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 3, p. 649-659, 2008/03/23 2008. ISSN 0916-8451. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.70708> >. Acesso em: 30 ago. 2015.

TARWOTJO, I. et al. Dietary practices and xerophthalmia among Indonesian children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 35, n. 3, p. 574-581, 1982. Disponível em: < <http://ajcn.nutrition.org/content/35/3/574.abstract> >. Acesso em: 18 ago. 2015.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends Anal. Chem.**, v.23, p. 535-552, 2004

TAYLOR, S. L. et al. Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL Expert Panel. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 9-17, 1// 2014. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513007072> >. Acesso em: 08 out. 2016

TAYLOR, S. L. et al.. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: How much is too much? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 1, p. 24-30, 1// 2002. ISSN 0091-6749. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674902711378> >. Acesso em: 08 out. 2016

TAYLOR, S. L. et al. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much? **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, n. 5, p. 689--695, 2004. ISSN 1365-2222. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.1886.x> >. Acesso em: 11 set. 2015.

THOMPSON, M.; ELISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, v.74, p. 835-855, 2002

TINI, M. et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 131, n. 3, p. 569-574, 3// 2002. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643301005086> >. Acesso em: 09 out. 2016

TONG, P. et al. Effect of heat treatment on the potential allergenicity and conformational structure of egg allergen ovomucoid. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 603-610, 3/15/ 2012. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611012933> >. Acesso em: 15 set. 2015.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137-145, 2// 2004. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993604002018> >. Acesso em: 13 nov. 2016

TÖRÖK, K. et al. Identification of the factors affecting the analytical results of food allergen ELISA methods. **European Food Research and Technology**, v. 241, n. 1, p. 127-136, 2015/07/01 2015. ISSN 1438-2377. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-015-2441-y> >. Acesso em: 22 set. 2015.

TÖRÖK, K. et al. Investigation of incurred single- and multi-component model food matrices for determination of food proteins triggering allergy and coeliac disease. **European Food Research and Technology**, v. 239, n. 6, p. 923-932, 2014// 2014. ISSN 1438-2385. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-014-2289-6> >. Acesso em: 30 mar. 2016

UBABEF. União Brasileira de Avicultura e Exportadores de Frango. **A saga da avicultura brasileira: como o Brasil se tornou o maior exportador mundial de carne de frango/** [coordenação Sergio Costa; tradução Vice Versa Tradução Escrita e Interpretação]. - Rio de Janeiro: Insight; São Paulo: UBABEF, 2011. 120p.

URREGO ÁLVAREZ, J. R.; HERNÁNDEZ BONFANTE, L. D. C.; MARRUGO CANO, J. Factores epidemiológicos en la inmunopatogénesis de la alergia a los alimentos. **Revista Salud Uninorte**, v. 25, n. 2, p. 258-279, 2009. ISSN 0120-5552.

USDA. United States Department of Agriculture. **National Nutrient Database for Standard Reference.** Disponível em: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>>. Acesso em: 05 ago. 2015

VAN COILLIE, E.; DE BLOCK, J.; REYBROECK, W. Development of an Indirect Competitive ELISA for Flumequine Residues in Raw Milk Using Chicken Egg Yolk Antibodies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 4975-4978, 2004. ISSN 0021-8561.

VESSMAN, J. et al. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J. A.; VAN DE WIEL, H. J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. **Anal. Chim. Acta**, v. 391, p. 159-171, 1999

WADE, P. **Biscuits, cookies, and crackers.** Elsevier applied science, 1988. ISBN 1851661875.

WANG, G. et al. Accelerated Solvent Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry for Determination of Polycyclic Aromatic

Hydrocarbons in Smoked Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1062-1066, 1999/03/01 1999. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf980956h> >. Acesso em: 14 jan. 2017

WHO. World Health Organization. **Health Implications of Acrylamide in Food**; Report of a Joint FAO/WHO Consultation; Department of Protection of the Human Environment, WHO: Geneva, Suíça, 2002.

WU, J.; ACERO-LOPEZ, A. Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 480-487, 5// 2012. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911004522> >. Acesso em: 11 set. 2015.

YAMANISHI, R. et al. Adjuvant activity of alum in inducing antigen specific IgE antibodies in BALB/c mice: A reevaluation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 166-169, 2003. ISSN 09168451.

YMAN, I. M. et al. Analysis of food proteins for verification of contamination or mislabelling. **Food and Agricultural Immunology**, v. 6, n. 2, p. 167-172, 1994/01/01 1994. ISSN 0954-0105. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/09540109409354827> >. Acesso em: 13 nov. 2015

YU, Z. et al. Application and bioactive properties of proteins and peptides derived from hen eggs: opportunities and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 14, p. 2839-2845, 2014. ISSN 1097-0010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6670> >. Acesso em: 23 ago. 2015.