

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Dissertação

**Determinação de glúten em produtos de panificação por teste Elisa e por
Imunocromatografia**

Pamela dos Santos Hellwig

Pelotas, 2020

Pamela dos Santos Hellwig

**Determinação de glúten em produtos de panificação por teste Elisa e por
Imunocromatografia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Arocha Gularte
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Torma Botelho

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

H476d Hellwig, Pamela dos Santos

Determinação de glúten em produtos de panificação por teste Elisa e por Imunocromatografia / Pamela dos Santos Hellwig ; Márcia Arocha Gularte, orientadora ; Fabiana Torma Botelho, coorientadora. — Pelotas, 2020.

69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Doença celíaca. 2. Testes imunoenzimáticos. 3. Confiabilidade. I. Gularte, Márcia Arocha, orient. II. Botelho, Fabiana Torma, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Maria Inez Figueiredo Figs Machado CRB: 10/1612

Pamela dos Santos Hellwig

Determinação de glúten em produtos de panificação por teste Elisa e por
Imunocromatográfica

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 30 de novembro de 2020

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Márcia Arocha Gularte (orientadora)

Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Caroline Dellinghausen Borges

Doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Rosana Colussi

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo e Leni, que sempre me apoiaram nos caminhos que decidi seguir e nunca mediram esforços para que eu pudesse conquistar todos os meus sonhos. Serei eternamente grata pelo carinho, cuidado, proteção e preocupação com a minha formação profissional e pessoal.

Às minhas queridas irmãs, Paola e Laira, pela compreensão, pelo incentivo diário, pela ajuda, pelas alegrias por estarem sempre ao meu lado presente em todos os momentos, muito obrigada por estarem sempre me apoiando.

À minha orientadora acadêmica, Prof^a. Dr^a. Márcia Arocha Gularte, excelente profissional e pessoa. Gostaria de agradecer por toda atenção, paciência, carinho, compreensão, amizade e por todo conhecimento adquirido.

Ao Departamento de Nutrição e Alimentos, pela oportunidade, ensinamentos, auxílios profissionais e amizade.

Aos meus queridos e atenciosos colegas de laboratório, em especial a todo grupo do laboratório de Análise Sensorial, a minha colega de programa de pós-graduação Márcieli Assumpção, por toda ajuda durante as análises desta dissertação, ao Pedro e a Carol da Biotecnologia que não mediram esforços para auxiliar na realização das análises de ELISA. Obrigada pela amizade, apoio e incentivo. Este trabalho certamente não seria o mesmo sem a contribuição de vocês.

Aos componentes da banca, agradeço a cortesia por aceitarem integrar a banca de exame desta dissertação.

RESUMO

HELLWIG, Pamela dos Santos. **Determinação de glúten em produtos de panificação por teste Elisa e por Imunocromatografia**. 2020. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A doença celíaca (DC) é caracterizada por uma desordem sistêmica autoimune, desencadeada através da ingestão de glúten em alimentos ou absorção por vias aéreas. É caracterizada pela inflamação crônica da mucosa do intestino delgado ocasionando uma atrofia das vilosidades intestinais, inadequada absorção intestinal e outras manifestações clínicas ou assintomáticas. O glúten é um conjunto de proteínas que está presente nos cereais como trigo, centeio, cevada e malte. A constituição do glúten ocorre pela junção das proteínas gliadina e glutenina, a gliadina é responsável pela extensibilidade do glúten ficando dispersa entre a glutenina desenvolvendo um filme elástico forte que envolve os grânulos de amido. A ocorrência da DC se dá em indivíduos com predisposição genética à doença, sendo observada principalmente na infância, mas pode surgir em qualquer fase da vida. O único tratamento para a DC é baseado na total exclusão de alimentos com glúten da dieta. O sucesso da dietoterapia dos portadores de DC está relacionado com a adaptação do indivíduo à dieta, com a confiabilidade dos rótulos dos alimentos e com a eliminação da contaminação cruzada de alimentos. As análises em produtos alimentícios são necessárias para assegurar a confiabilidade dos alimentos. As gliadinas podem ser detectadas através de espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta resolução, análise de DNA e métodos imunológicos (ELISA). Diante disso, objetivou-se com o estudo realizar um questionário online com pessoas celíacas sobre principais produtos consumidos por eles e seus conhecimentos sobre a doença, e analisar produtos de panificação sem glúten (pães, bolos, bolachas e pão de queijo, entre outros) através do teste ELISA e por fitas imunocromatográficas. A maioria dos respondentes do questionário eram mulheres, com ensino superior, todos os respondentes disseram saber o que é glúten, 92% seguem dieta sem glúten e 81% consomem produtos de panificação sem glúten. O produto sem glúten mais consumido por eles foi o pão e para quase 50% dos entrevistados a maior dificuldade foi realizar as refeições fora de casa. Pelo método de ELISA todas as amostras apresentaram resultados negativos para a presença de glúten e para as fitas imunocromatográficas quatro das amostras analisadas foram positivas para a presença de glúten.

Com estes resultados podemos concluir que a maioria dos consumidores de produtos sem glúten possuem doença celíaca e ainda encontram dificuldades de realizar refeições fora de casa. Os resultados das fitas imunocromatográficas apresentaram divergência com o teste de ELISA R5, porém as fitas não demonstram um número exato da concentração, somente uma faixa de valor. O uso do teste imunocromatográfico demonstrou uma excelente opção para garantir aos celíacos a qualidade do seu alimento em relação ao teor de glúten, além de ser uma análise mais rápida e de fácil execução.

Palavras-chaves: Doença Celíaca; Testes imunoenzimáticos; Confiabilidade

ABSTRACT

HELLWIG, Pamela dos Santos. **Determination of gluten in bakery products by Elisa test and by Immunochromatography.** 2020. 69 f. Dissertation (Master's) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Celiac disease (CD) is characterized by a systemic autoimmune disorder, triggered by the ingestion of gluten in food or absorption through the airways. It is characterized by chronic inflammation of the small intestine mucosa causing atrophy of the intestinal villi, inadequate intestinal absorption and other clinical or asymptomatic manifestations. Gluten is a set of proteins that is present in cereals such as wheat, rye, barley and malt. The constitution of gluten occurs by the junction of the proteins gliadin and glutenin, the gliadin is responsible for the extensibility of the gluten being dispersed among the glutenin developing a strong elastic film that surrounds the starch granules. The occurrence of CD occurs in individuals with a genetic predisposition to the disease, being observed mainly in childhood, but can occur at any stage of life. The only treatment for CD is based on the total exclusion of gluten foods from the diet. The success of diet therapy for CD patients is related to the individual's adaptation to the diet, the reliability of food labels and the elimination of cross-contamination of food. Food product analyzes are necessary to ensure food reliability. Gliadins can be detected by mass spectrometry, high performance liquid chromatography, DNA analysis and immunological methods (ELISA). Therefore, the objective of the study was to carry out an online questionnaire with celiac people about the main products consumed by them and their knowledge about the disease, and to analyze gluten-free bakery products (breads, cakes, cookies and cheese bread, among others) through the ELISA test and by immunochromatographic tapes. Most respondents to the questionnaire were women, with higher education, all respondents said they knew what gluten is, 92% follow a gluten-free diet and 81% consume gluten-free bakery products. The most consumed gluten-free product for them was bread and for almost 50% of the interviewees the greatest difficulty was eating meals outside the home. By the ELISA method, all samples showed negative results for the presence of gluten and for the immunochromatographic strips four of the analyzed samples were positive for the presence of gluten. With these results we can conclude that the majority of consumers of gluten-free products have celiac disease and still find it difficult to eat meals outside the home. The results of the immunochromatographic tapes differed with the ELISA R5 test, however the tapes do not show an exact number of the concentration, only a value range. The use of the immunochromatographic test demonstrated an excellent option to guarantee celiacs the quality of their food in relation to the gluten content, in addition to being a faster and easier analysis.

Keywords: Celiac disease; Immunoenzymatic tests; Reliability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O grão de trigo e sua constituição. FONTE: PITÉ, 2007.....	5
Figura 2 - Estrutura do glúten: gliadina e glutenina. Fonte: FASANO et al, 2008.	5
Figura 3 - Iceberg Celíaco representando a classificação da Doença Celíaca com a nomenclatura adotada pela ESPGHAN.	9
Figura 4 - Figura referente ao esquema simplificado para análise imunoenzimática de ELISA R5.....	26
Figura 5 - Figura referente ao esquema simplificado para análise das fitas imunocromatográficas.	28
Figura 6 - Gráfico referente a faixa etária dos participantes.....	31
Figura 7 - Gráfico referente ao sexo dos participantes.....	31
Figura 8 - Gráfico referente a escolaridade dos participantes.....	31
Figura 9 - Gráfico referente a pergunta o que é glúten?	32
Figura 10 - Gráfico referente ao consumo de produtos de panificação sem glúten.	32
Figura 11 - Gráfico referente a frequência de consumo de produtos de panificação sem glúten.....	32
Figura 12 - Gráfico referente a realizar algum tipo de dieta com restrição de glúten.	32
Figura 13 - Gráfico referente a possuir alguma enfermidade com relação ao glúten.	33
Figura 14 - Gráfico referente a encontrar produtos sem glúten com facilidade.....	33
Figura 15 - Gráfico referente a consumir produtos sem glúten serem seguros para o consumo.....	33
Figura 16 - Gráfico referente as maiores dificuldades com relação as restrições da alimentação sem glúten.....	33
Figura 17 - Gráfico referente ao consumo de produtos de panificação que contenham glúten por participantes celíacos.	34
Figura 18 - Gráfico referente ao motivo que levou os participantes ao consumo de produtos sem glúten.....	34
Figura 19 - Gráfico referente a diferença ou alteração na saúde ao trocar produtos com glúten por produtos sem glúten.	34
Figura 20 - Gráfico referente a diferença entre os produtos com glúten e sem glúten.	34
Figura 21 - Interpretação do resultado conforme fabricante das fitas imunocromatográficas.	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Concentração x absorbância das amostras da 1 ^a dia.....	40
Gráfico 2 - Concentração x absorbância das Amostras da 2 ^a dia.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos alimentos permitidos e proibidos para portadores de DC	16
Tabela 2 - Estatísticas descritivas (Dados quantitativos):	35
Tabela 3 - Análise da variância (Escolaridade):	35
Tabela 4 - Análise da Soma de Quadrados da variável Escolaridade:.....	36
Tabela 5 - Codificação das amostras	38
Tabela 6 - Concentração e Absorbância das Concentrações Padrão (Standards) 1ª dia	39
Tabela 7 - Resultados das Amostras da 1ª dia	39
Tabela 8 - Concentração e Absorbância das Concentrações Padrão da 2ª dia.	40
Tabela 9 - Resultados das Amostras da 2ª dia	40
Tabela 10 – Comparação dos resultados entre os métodos	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Glúten	4
2.2. Doença celíaca	6
2.3. Diagnóstico de doença celíaca	9
2.4. Contaminação cruzada por glúten em alimentos	11
2.5. Legislação dos produtos sem glúten	12
2.6. Alimentação dos celíacos	14
2.7. Métodos de identificação do glúten	17
2.8. Pesquisa com consumidores sobre produtos sem glúten	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.2.1. Questionário de avaliação do consumo de produtos sem glúten	22
3.2.2. Determinação dos alimentos analisados	22
3.2.3. Preparo das amostras	23
3.2.4. Extração das amostras e análise por ensaio imunoenzimático (ELISA R5)	23
3.2.5. Análise por fitas imunocromatográficas	26
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Questionário de avaliação do consumo de produtos sem glúten	30
5.2. Análise por ensaio Imunoenzimático (ELISA R5)	37
5.3. Análise por fitas Imunocromatográficas	42
5.4. Comparação entre os métodos ELISA e fitas imunocromatográficas	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO SOBRE DOENÇA CELÍACA E ALIMENTAÇÃO	54
APÊNDICE B – TABELA COM ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DO QUESTIONÁRIO (DADOS QUALITATIVOS)	57

1. INTRODUÇÃO

A Doença Celíaca (DC) é uma desordem sistêmica autoimune, desencadeada através da ingestão de glúten em alimentos ou através da absorção pelas vias aéreas que ao ser exposto ao glúten, desencadeia uma resposta anormal no sistema imunológico, produzindo uma série de anticorpos que podem afetar diversos órgãos, o que ocorre da mesma forma através da ingestão de alimentos fonte de glúten. No intestino delgado, esta resposta imune provoca uma reação inflamatória ocasionando atrofia das vilosidades intestinais de tamanho o que afeta a absorção de nutrientes pelo intestino, o que em muitos casos leva a anemia e outras manifestações clínicas. (ACELBRA, 2018). A prevalência de DC é estimada em aproximadamente 1% da população mundial. No Brasil, segundo a Associação de Celíacos do Brasil (ACELBRA), há um portador da doença celíaca para cada 600 habitantes. Porém o número de celíacos, pode ser ainda maior devido aos casos contabilizados ser referentes somente aos já diagnosticados (ACELBRA, 2018).

O glúten é formado por um conjunto de proteínas que está presente nos cereais como trigo, centeio, cevada, aveia e malte, podemos dizer que o glúten é uma mistura das proteínas compostas por prolaminas e glutelinas. As gliadinas do trigo pertencem a uma categoria de proteínas chamadas de prolaminas e as gluteninas, à das glutelinas. A aveia em quantidades moderadas é geralmente tolerada, por ser livre de glúten na sua composição genética, porém muitas vezes acaba sendo contaminada por outros cereais com glúten devido seu armazenamento e processamento. A fração proteica do glúten solúvel em álcool é chamada de prolamina e a insolúvel de glutenina. Ambas são ricas nos aminoácidos: glutamina e prolina. (ACELBRA, 2018).

A alimentação em um aspecto nutricional pode envolver diversos fatores históricos e culturais de acordo com cada época e dessa forma influenciam nos hábitos, nas referências alimentares e nos diferentes tipos de dietas no Brasil e em diversos outros países pelo mundo. A ausência de glúten na dieta permite a reparação das mucosas do intestino, alivia os sintomas e diminui o risco de complicações na maioria das pessoas (FREITAS et al., 2011).

Conforme a Lei nº 11346/2006, a segurança alimentar e nutricional consiste no direito de todas as pessoas ao acesso regular e permanente dos

alimentos perante qualidade, quantidade e sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares provenientes de saúde, respeitando a diversidade cultural, ambiental, econômica e socialmente sustentáveis, bem como na existência de patologias na população (BRASIL, 2006).

Conforme o CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2008), a quantidade máxima permitida é de 20 ppm de glúten/kg de alimento para que possam ser considerados alimentos isentos ou “livres” de glúten. Neste sentido, o alimento produzido deverá respeitar a legislação para a fabricação de alimentos sem adição de trigo, centeio, cevada e aveia ou ter sido tratado para reduzir o teor de glúten em quantidades inferiores a 20 ppm/kg.

Como o único tratamento para a DC é baseado na total exclusão de alimentos fonte de glúten da dieta, o celíaco deve sempre conhecer e fazer a leitura minuciosa dos ingredientes que compõem o alimento. Além disso, a população relata que a oferta de alimentos apropriados é restrita, o que torna a dieta monótona, pois a maioria dos produtos disponíveis no mercado são normalmente de alto custo. É importante destacar que o sucesso da dietoterapia dos portadores de DC está relacionado com a adaptação do indivíduo à dieta, com o entendimento das informações contidas nos rótulos dos alimentos, assim como a total exclusão de medicamentos que possuem em sua formulação o glúten e com a eliminação da contaminação cruzada de alimentos (ARAÚJO et al., 2010).

As análises em produtos alimentícios são necessárias para assegurar a qualidade e confiabilidade dos alimentos, uma vez que as gliadinas (prolaminas) podem ser detectadas através de espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta resolução, análise de DNA e métodos imunológicos qualitativos (fitas imunocromatográficas) e quantitativos (ELISA R5) (BARBOSA et al, 2007).

A técnica ELISA R5 e as fitas imunocromatográficas foram selecionadas neste trabalho, pois ambas possuem o tipo de técnica considerada padrão-ouro para esse tipo de análise, sendo recomendada pelo CODEX ALIMENTARIUS e pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Ambas as análises são baseadas na ação do anticorpo monoclonal que reconhece a sequência tóxica do pentapeptídeo ‘Glutamina-Glutamina-Prolina-Fenilalanina-Prolina’, detectando o glúten de diferentes variedades de trigo, centeio e cevada em

produtos aquecidos ou não e não reage com as prolaminas do milho, arroz e aveia (CODEX, 2008; AOAC, 2012)

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo realizar uma pesquisa online com portadores da doença celíaca sobre produtos sem glúten consumidos por eles e seus conhecimentos sobre a doença. E, a partir dessa pesquisa verificar a presença de glúten em produtos de panificação industrializados: pães, bolos, biscoitos/bolachas, mistura para bolos, mistura para pães, mistura para pão de queijo, massa de arroz, fécula de mandioca (tapioca), granola sem glúten, farinha de arroz, fermento químico para bolo e avaliar se as informações apresentadas nas embalagens são fidedignas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Glúten

O glúten é formado por proteínas pertencentes as classes das prolaminas e as glutelinas. Essas proteínas estão presentes em diversos cereais. Cada tipo de cereal possui sua respectiva fração proteica do glúten, tóxica ao paciente com DC. De acordo com o cereal de origem, a prolamina (representa 50% da quantidade total da proteína) recebe diferentes nomes, por exemplo, no trigo denomina-se gliadina; na aveia, avenina; no centeio, secalina; e na cevada, hordeína. As prolaminas são insolúveis em água e solúveis somente em álcool, já as glutelinas são insolúveis em água e álcool (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). A Figura 1 abaixo representa a estrutura de um grão de trigo e sua constituição.

As prolaminas existentes nos cereais sofrem digestão incompleta no intestino delgado e são altamente tóxicas para os celíacos, pois contém peptídeos ativadores da inflamação intestinal (FASANO et al., 2008, SOUZA et al., 2015). As prolaminas são denominadas de acordo com a sua composição de aminoácidos, com elevado teor em prolina e glutamina e são designadas por α , β -, γ - e ω -prolaminas de acordo com a sua mobilidade em eletroforese e valores de pH baixo e de acordo com a sua sequência de aminoácidos. As gluteninas podem ser separadas em unidades de baixo peso molecular (LMW) e de elevado peso molecular (HMW) (FASANO et al., 2008, SOUZA et al., 2015).

As prolaminas não são digeridas a nível intestinal, portanto, atravessam de forma intacta a mucosa sendo reconhecida pela enzima Transglutaminase Humana II ou também conhecida como Transglutaminase Tecidual, que é responsável em apresentar os peptídeos do glúten ao Antígeno Leucocitário Humano (HLA) dando início ao processo inflamatório da DC (LUDVIGSSON et al., 2012).

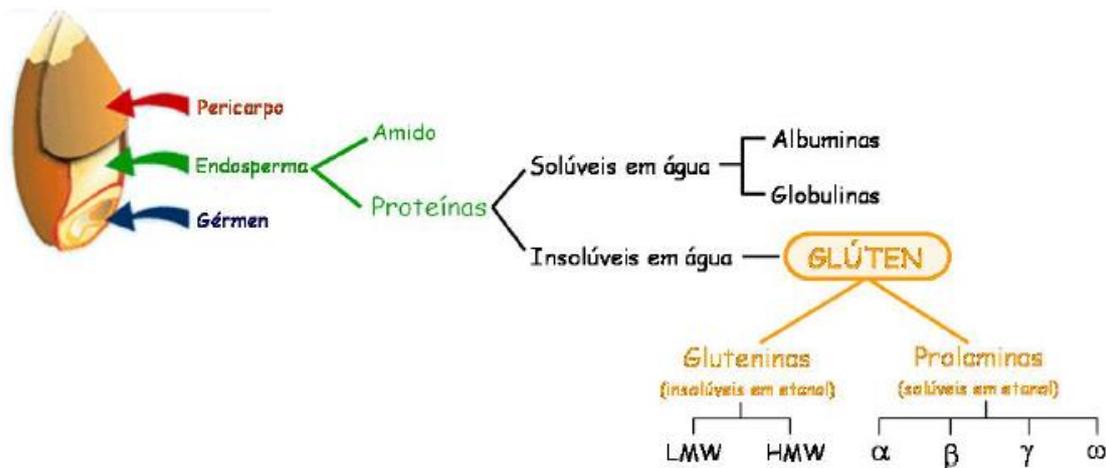


Figura 1 - O grão de trigo e sua constituição. FONTE: PITÉ, 2007.

Na formulação dos produtos de panificação as moléculas que formam o glúten têm grande valor devido à sua elasticidade e a extensibilidade, conforme demonstrado na Figura 2. Ao assar a massa o CO₂ expande as colunas de glúten e juntamente com a água formam uma rede tridimensional viscoelástica que é distribuída homogeneamente por toda extensão da massa, por isso dentre os cereais que contém glúten o que apresenta maior produção e consumo no mundo é o trigo (ARAÚJO et al., 2010).

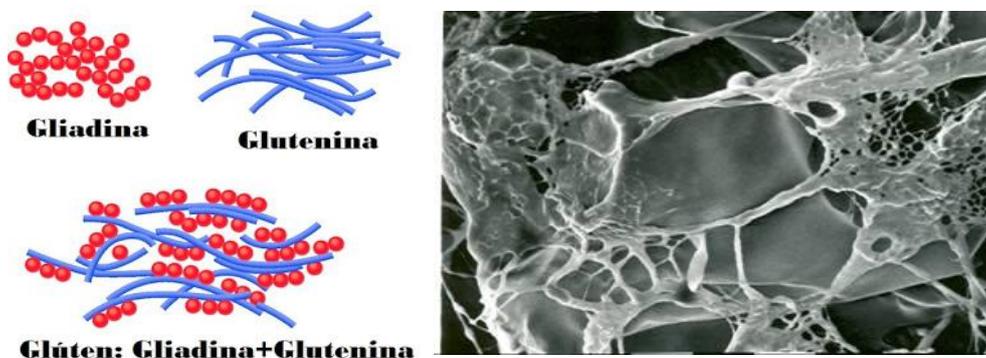


Figura 2 - Estrutura do glúten: gliadina e glutenina. Fonte: FASANO et al, 2008.

A quantidade total de proteínas existente no grão de trigo varia entre 8 e 21%. Desta fração 15% correspondem a globulinas e albuminas que não são formadoras de glúten e 85% correspondem a gliadina e a glutenina que combinadas têm a propriedade de formar o glúten. Quanto mais glúten tiver a composição da farinha mais consistente, flexível e elástica será a massa (Figura 2) (FASANO et al., 2008, SOUZA et al., 2015).

A farinha de trigo é a mais aplicada na produção de massas, produtos de panificação e de confeitaria, pois as proteínas gliadina e glutenina em contato com água aumentem em até 200% o seu peso inicial, conferindo elasticidade, adesividade e capacidade de retenção de gás (Figura 2) permitindo que essa massa formada possa ser esticada e estendida pela ação de misturar, bater e sovar. Também é utilizada no espessamento de preparações e pode ser encontrada em produtos industrializados, como por exemplo na produção de café (que contenha cevada na sua composição), achocolatados em pó, sorvetes, chicletes, sopas e papinhas industrializadas, comidas desidratadas, embutidos, produtos cárneos, maioneses, molhos de tomate, mostardas, iogurtes, ketchup e diversos alimentos destinados para alimentação infantil (ARAUJO et al., 2010).

Segundo os dados do CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), no Brasil a produção de trigo concentra-se na região Sul, sendo o Paraná e Rio Grande do Sul os principais produtores. Em 2019 o trigo teve sua produção estimada em 5,4 milhões de toneladas. (BRASIL, 2019).

2.2. Doença celíaca

A doença celíaca (DC) é uma doença crônica inflamatória que acomete o intestino delgado sendo de caráter autoimune desencadeada por três elementos: suscetibilidade genética, resposta autoimune e exposição ao glúten. Atualmente estima-se que a prevalência de DC afete, aproximadamente, 1% da população mundial. Como consequência da reação imune local, ocorre inflamação da mucosa intestinal e atrofia vilositária, sendo caracterizada por um processo inflamatório do intestino delgado mediada por linfócitos T, onde nesses pacientes existe um aumento da infiltração dos linfócitos nas células epiteliais chegando a uma proporção de 25/100 células. Existem três formas de apresentação clínica da DC reconhecidas: clássica ou típica, não clássica ou atípica e assintomática ou silenciosa (FASANO et al., 2008; SAPONE et al. 2012; YUAN et al. 2013; SOUZA, 2015; LUND et al., 2015).

De acordo com a Portaria nº 307, de 17 de setembro de 2009 do Ministério da Saúde a DC pode ter três formas de apresentação:

1- Forma Clássica ou Típica: caracterizada pela presença de diarreia crônica, em geral acompanhada de distensão abdominal e perda de peso. O paciente também pode apresentar diminuição do tecido celular subcutâneo,

atrofia da musculatura glútea, falta de apetite, alteração de humor (irritabilidade ou apatia), vômitos e anemia. Essa forma clínica pode ter evolução grave, conhecida como crise celíaca, que ocorre quando há retardo no diagnóstico e tratamento adequado, particularmente entre o primeiro e o segundo anos de vida, e frequentemente desencadeada por infecção. Essa complicação potencialmente fatal se caracteriza pela presença de diarreia com desidratação hipotônica grave, distensão abdominal por hipopotassemia e desnutrição grave, além de outras manifestações como hemorragia e tetania.

2- Forma não Clássica ou Atípica: caracteriza-se por quadro mono ou oligossintomático, em que as manifestações digestivas estão ausentes ou, quando presentes, ocupam um segundo plano. Os pacientes deste grupo podem apresentar manifestações isoladas, como, por exemplo, baixa estatura, anemia por deficiência de ferro refratária à reposição de ferro por via oral, anemia por deficiência de folato e vitamina B12, osteoporose, hipoplasia do esmalte dentário, artralguas ou artrites, constipação intestinal refratária ao tratamento, atraso puberal, irregularidade do ciclo menstrual, esterilidade, abortos de repetição, ataxia, epilepsia (isolada ou associada à calcificação cerebral), neuropatia periférica, miopatia, manifestações psiquiátricas (depressão, autismo, esquizofrenia), úlcera aftosa recorrente, elevação das enzimas hepáticas sem causa aparente, fraqueza, perda de peso sem causa aparente, edema de aparição abrupta após infecção ou cirurgia e dispepsia não ulcerosa.

3- Forma Assintomática ou Silenciosa: caracterizada por alterações sorológicas e histológicas da mucosa do intestino delgado compatíveis com DC, na ausência de manifestações clínicas. Essa situação pode ser comprovada especialmente entre grupos de risco para a DC como, por exemplo, parentes de primeiro grau de pacientes com DC, e vem sendo reconhecida com maior frequência nas últimas duas décadas, após o desenvolvimento dos marcadores sorológicos para esta doença. Deve-se mencionar a dermatite herpetiforme, considerada DC da pele, que se apresenta com lesões cutâneas do tipo bolhoso e intensamente pruriginoso e que se relaciona também com a intolerância permanente ao glúten.

Atualmente, os sintomas atípicos tem sido considerados mais frequentes que os sintomas clássicos assim como também vem se estudando a presença do gene HLA (*Human Leukocyte Antigen*) que representa o principal fator

genético de risco para o desenvolvimento da DC. Por esse motivo a Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) recomenda a utilização da figura em forma de iceberg para definir a doença celíaca, de acordo com a Figura 3 (HUSBY et al., 2012):

- **Sinais e sintomas gastrointestinais:** diarreia crônica, constipação, distensão abdominal, vômitos, anorexia, dor abdominal e irregularidade de hábito intestinal.

- **Sinais e sintomas extra-intestinais:** anemia, neuropatia, diminuição da densidade óssea, perda de peso, baixa estatura, irritabilidade, aumento de enzimas hepáticas e fadiga crônica.

- **Doença celíaca silenciosa:** presença de anticorpos específicos, HLA e biópsia intestinal compatível com Doença Celíaca, porém sem sinais e sintomas suficientes para provocar uma suspeita clínica.

- **Doença celíaca latente:** presença do gene HLA compatível, sem enteropatia, mas que apresentará enteropatia em outro momento de sua vida. Poderá ou não ter sintomas e/ou anticorpos específicos positivos.

- **Doença celíaca potencial:** presença de anticorpos específicos e HLA compatível, mas sem anormalidades histológicas na biópsia duodenal. O paciente pode ou não apresentar sinais e sintomas assim como desenvolver enteropatia posteriormente.

A utilização da imagem de um iceberg (Figura 3) surgiu para demonstrar a existência de um número grande de pessoas portadoras de DC, porém apenas uma pequena parte dessas pessoas apresentam sintomas que são detectados clinicamente. A partir dessa constatação foi definido uma outra maneira de se definir a doença nesses indivíduos, em especial, nos grupos considerados de maior risco para a doença (DINIZ-SANTOS, D; MACHADO; SILVA, 2012).

Diversas pesquisas tem demonstrado que a prevalência de DC é aumentada na presença de síndrome de Down, síndrome de Turner, síndrome de Williams e deficiência de Imunoglobulina A (IgA) seletiva, além de doenças autoimunes englobando diabetes mellitus tipo 1, artrite reumatoide, tireoidite e câncer. Os celíacos têm risco aumentado para desenvolvimento de linfomas intestinais, os tipos mais frequentes são linfomas não-Hodkin de células B ou T. A atual causa de mortalidade entre os celíacos é a neoplasia maligna, dentre

estas, um terço é causada por linfomas do tipo não-Hodkin (MAHAN et al., 2012; TAYLOR et al., 2015; HAN et al., 2015).

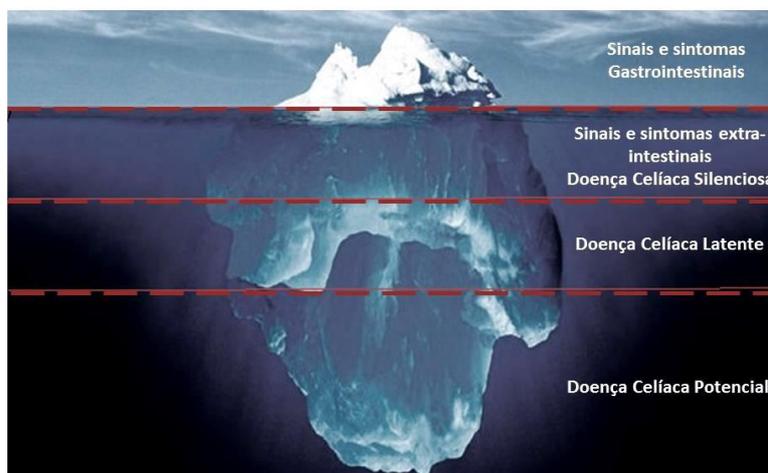


Figura 3 - Iceberg Celíaco representando a classificação da Doença Celíaca com a nomenclatura adotada pela ESPGHAN.

No Brasil a DC afeta em torno de 2 milhões de pessoas, no entanto a maioria delas encontra-se sem diagnóstico e sua incidência é pouco conhecida. A prevalência da DC no país não possui uma estimativa exata devido à poucos trabalhos realizados que abordam os aspectos epidemiológicos, clínicos ou laboratoriais da DC, assim como também seu diagnóstico não é preciso já que o número de celíacos, pode ser superior ao relatado, em que as pesquisas apontam apenas os casos que já foram diagnosticados. Entretanto, dados encontrados na página da Associação Brasileira de Doença Celíaca de São Paulo (ACELBRA/SP) apontam que os estados com maior prevalência de DC seriam São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso, no qual 57% dos celíacos teriam idade de até 20 anos (ACELBRA/SP, 2004; SOUZA, 2015).

2.3. Diagnóstico de doença celíaca

A primeira padronização do diagnóstico da DC foi proposta em 1969 pela Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica. O critério diagnóstico recomendava que fosse sucedida uma primeira biópsia de intestino delgado, seguido de dois anos de dieta restrita em glúten aliado à biópsia de controle. Caso esta estivesse normal, era necessário a instituição da dieta contendo glúten por um período de 3 meses ou até o surgimento dos sintomas (BRASIL, 2015)

Em 1990 houve modificação nos testes sorológicos modificando os critérios para diagnóstico da doença, dispensando a terceira biópsia na maioria dos pacientes. Haveria exceções quando o diagnóstico fosse estabelecido antes dos 2 anos de idade ou quando houvesse dúvida com relação ao diagnóstico inicial, como por exemplo, falta de evidências de resposta clínica à dieta sem glúten, não realização de biópsia inicial ou biópsia inadequada ou exame histopatológico não típico da DC (BRASIL, 2015).

Outra maneira de diagnóstico são os marcadores sorológicos que contribuem para identificar os indivíduos que devem ser submetidos à biópsia de intestino delgado. Esses marcadores também são úteis para acompanhamento do paciente celíaco, podendo ser utilizado, para detectar transgressão à dieta. Os principais testes sorológicos para a detecção da intolerância ao glúten são: o anticorpo antigliadina, o anticorpo antiendomísio e o anticorpo antitransglutaminase (TTG) (BRASIL, 2015).

O anticorpo antigliadina foi descrito em 1978, é determinado pela técnica de ELISA, a especificidade do anticorpo é da classe imunoglobulina A (IgA) (71% a 97% nos adultos e 92% a 97% nas crianças) e é maior do que da classe imunoglobulina G (IgG) (50%), sendo a sensibilidade extremamente variável. O anticorpo antiendomísio também é da classe IgA e é identificado por meio de imunofluorescência indireta. Esse anticorpo apresenta alta sensibilidade em adultos (87% a 89%) e em crianças maiores de dois anos (88% a 100%), e alta especificidade (91% a 100% nas crianças e 99% em adultos). Entretanto, apresenta pior relação custo/benefício e técnica mais trabalhosa para sua detecção. Atualmente é a técnica considerada como padrão ouro para determinar a presença de glúten pelo CODEX ALIMENTARIUS e pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* (VALDES et al., 2003; CODEX ALIMENTARIUS, 2008; BRASIL, 2009; SILVA, 2010; AOAC, 2012; BRASIL, 2015).

Em resumo, há superioridade do anticorpo antiendomísio e do anticorpo antitransglutaminase, ambos da classe IgA, principalmente o anticorpo antitransglutaminase recombinante humana IgA, em relação ao antigliadina. Considerando a maior facilidade da dosagem do anticorpo antitransglutaminase, aliado à elevada sensibilidade e especificidade na população pediátrica e adulta, este é o teste sorológico de escolha para avaliação inicial dos indivíduos com

suspeita de intolerância ao glúten. Deve-se destacar que a deficiência de imunoglobulina A é responsável por resultados falsos negativos dos testes sorológicos antiendomísio e antitransglutaminase da classe IgA. Por este motivo, indica-se como testes diagnósticos iniciais da DC a dosagem sérica simultânea do anticorpo antitransglutaminase da classe IgA e da imunoglobulina A. Deve-se enfatizar que, até o momento, os marcadores sorológicos para DC não substituem o exame histopatológico do intestino delgado, que continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico de DC. Os testes sorológicos serão considerados testes diagnósticos iniciais, que identificam os indivíduos a serem encaminhados para a biópsia duodenal (BRASIL, 2009).

2.4. Contaminação cruzada por glúten em alimentos

Uma das maiores dificuldades encontradas pelos celíacos é o alto risco de contaminação cruzada em estabelecimentos comerciais e a falta de informação segura nos rótulos das preparações. Por este motivo, desde 2003, segundo a Lei nº 10.674, as indústrias alimentícias são obrigadas a publicar nas embalagens a inscrição “contém glúten” ou “não contém glúten”, porém essa lei não se aplica a preparações de estabelecimentos comerciais, o que dificulta o tratamento e a manutenção da DC, gerando dificuldade no convívio social dos portadores de DC. A falta de conhecimento e informações sobre a doença na maioria das vezes acaba restringindo ainda mais os alimentos que podem ser consumidos pelos Celíacos, assim como também os estabelecimentos que eles frequentam (BRASIL, 2003).

A contaminação cruzada ocorre quando um alimento naturalmente sem glúten entra em contato com algum alimento que contém glúten, como exemplos: uma batata que é frita em um óleo onde foi processada e elaborada uma preparação com glúten, acarreta em um alimento com contaminação de glúten; usar o mesmo forno para assar o pão e/ou biscoito feito com farinha sem glúten e o que é feito com glúten; o uso de utensílios utilizados para confeccionar um alimento com glúten não higienizado adequadamente e em seguida empregado em uma preparação sem glúten gerando contaminação cruzada (ARAÚJO et al., 2010).

Podemos dizer que o alimento livre de glúten ou que contenha traços de glúten não pode exceder o limite considerado seguro de até 20 ppm, se esse

limite for excedido então podemos dizer que ocorreu contaminação cruzada através de procedimentos inadequados nas etapas de produção, armazenamento e fabricação. Na grande maioria dos estabelecimentos e fábricas o sistema de produção é constituído de um sistema misto de fabricação, ou seja, os produtos com e sem glúten são preparados em uma única linha de produção, sem os cuidados necessários para evitar a contaminação. Esses estabelecimentos normalmente dispõem do mesmo espaço físico, equipamentos e utensílios para a produção dos dois grupos de alimentos, o que representa risco ao consumidor celíaco (BICUDO, 2010; FARAGE et al., 2017, VERMA et al., 2017).

Dessa forma, portadores de DC podem estar constantemente expostos a alimentos contaminados com glúten, ou seja, que não são seguros para o seu consumo, mesmo quando estes alimentos são supostamente isentos de glúten. Segundo a Comissão Alimentar CODEX ALIMENTARIUS, a Organização Mundial de Saúde (OMS) em conjunto com a Organização de Alimento e Agricultura (FAO), “alimentos isentos de glúten” consistem ou são feitos de um ou mais ingredientes que não contêm trigo (todas as espécies *Triticum*), centeio, cevada e aveia ou suas variedades cruzadas, e o nível de glúten não pode exceder 20 ppm equivalente a 20 mg/Kg de peso total, baseando-se no alimento na forma que é vendido ao consumidor (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

2.5. Legislação dos produtos sem glúten

Não há ainda no país uma lei que estabeleça o limite máximo de glúten presente em alimentos comercializados como isentos de glúten. Além disso, não existe um sistema de vigilância em vigor para controle do teor de glúten nesses alimentos. Se esse controle não é realizado na indústria de alimentos, essa questão assume uma dimensão ainda mais problemática ao nível de estabelecimentos de pequeno porte (SILVA, 2010). Além de realizar o acompanhamento permanente e a educação nutricional com nutricionista, o portador de DC deve ainda incluir outros tipos de alimentos (frutas, hortaliças, alguns derivados de leite) para suprir as possíveis deficiências de nutrientes em seu organismo (LEE, 2003; AUTODORE; JATLA, 2009; WILD et al., 2010; CIACCI et al., 2015; SOARES, 2017).

No Brasil a lei que está em vigor atualmente é a RDC nº 40 de 8 de fevereiro de 2002 tornou obrigatório constar no rótulo a advertência “CONTÉM GLÚTEN” para os alimentos que contenham trigo, cevada, centeio, aveia ou malte e derivados e para bebidas embaladas, exceto bebidas alcóolicas (BRASIL, 2002). Posteriormente, foi publicada a lei nº 10.674 de 2003, que dita que todos os alimentos industrializados devem conter em seu rótulo a informação sobre a presença ou não de glúten em sua composição, de acordo com o caso e obriga as empresas a exibirem de forma clara nos rótulos desses produtos a presença ou ausência de glúten (“CONTÉM GLÚTEN” ou “NÃO CONTÉM GLÚTEN”). Porém não há exigência de comprovação com testes laboratoriais para a eventual presença de glúten, certificando assim que não tenha ocorrido contaminação cruzada na produção destes alimentos (BRASIL, 2003).

É importante destacar que produtos disponíveis no mercado podem conter traços de glúten, mesmo quando essa informação não está presente no rótulo. Pode não ser suficiente declarar a presença ou ausência de glúten somente nos rótulos em função dos ingredientes da composição do alimento, já que a contaminação é algo que pode ocorrer na cadeia de produção em decorrência de procedimentos inapropriados, quer sejam relacionados ao ambiente, utensílios, maquinário ou equipe responsável pela produção (ARAÚJO et al., 2010).

Outro grande problema enfrentado pelos celíacos é que não é possível estabelecer um único valor de ingestão de limiar de glúten considerado seguro para todos os celíacos, e por isso, assim delimitar que este seja o mínimo recomendado para se padronizar este valor na utilização dos rótulos. No estudo de Catassi et al. (2007) os resultados mostraram que a maioria dos pacientes tolerava até 50 mg de glúten por dia, o que permitiria um equivalente a 500 g de alimento contendo 20 ppm de glúten sem a ocorrência de complicações causadas pelo glúten. Por outro lado, em uma revisão sistemática de Akobeng e Thomas os autores observam que a quantidade tolerável de ingestão de glúten varia muito entre os pacientes com DC e eles sugerem que 10 mg de glúten por dia seria mais seguro e provavelmente não causaria anormalidades significativas (AKOBENG E THOMAS, 2008)

Portanto, no Brasil ainda não existe uma lei que estabeleça o limite máximo de glúten presente em alimentos comercializados como isentos de

glúten, como proposto pelo CODEX ALIMENTARIUS. Assim como, não existe um sistema de vigilância em vigor para inspeção e controle do teor de glúten nesses alimentos. Se esse controle não é realizado na indústria de alimentos, essa questão assume uma dimensão ainda mais problemática ao nível de estabelecimentos de pequeno porte, como restaurantes, panificadoras e outros serviços de alimentação, o que representam grande risco para o consumidor celíaco (SILVA, 2010).

2.6. Alimentação dos celíacos

O único tratamento para a Doença Celíaca é exclusivamente dietético sendo baseado na total exclusão de alimentos fonte de glúten, sendo eliminados todos os alimentos e medicamentos que contenham em sua composição o glúten proveniente do trigo, centeio, cevada, aveia e seus derivados. Para garantir uma dieta isenta de glúten, o celíaco deve sempre conhecer e fazer leitura minuciosa dos ingredientes que compõem o alimento. Além disso, os celíacos relatam que a oferta de alimentos apropriados é restrita, tornando a dieta monótona e de alto custo, visto que os produtos disponíveis no mercado apresentam maior valor quando comparados a produtos que não apresentem restrição ou isenção de glúten (ARAÚJO et al., 2010; BRASIL, 2015).

De acordo com a POF (Pesquisa de Orçamentos familiares) de 2009, cada vez mais os brasileiros estão realizando as refeições fora de casa, devido a mudanças de estilo de vida e rotina de trabalho atuais. Essa pesquisa também revelou que na área urbana, os panificados, juntamente com o leite e seus derivados, representaram a segunda maior participação na alimentação do domicílio e frequentemente os panificados são adquiridos em panificadoras. Esses dados refletem o hábito da população de se alimentar fora de casa e também a importância que os panificados assumem dentro do contexto alimentar dos brasileiros (IBGE, 2010)

Como dito anteriormente uma dieta totalmente isenta de glúten não constitui uma prática fácil. Os portadores de DC mesmo com o aumento dos produtos para celíacos disponíveis, têm relatado dificuldade de dar sequência ao tratamento dietético devido à pouca variedade de produtos existentes no mercado, poucas opções de marca e sabores, assim como também a falta de certificação de que os produtos realmente sejam isentos de glúten na sua

composição. Esse problema acaba gerando insegurança alimentar e nutricional para o indivíduo celíaco dificultando o acesso e a disponibilidade a estes produtos, este fato ocorre em razão de poucos produtos estarem disponíveis na maioria dos supermercados, ao alto custo destes produtos quando comparados aos produtos convencionais e que na maioria das vezes acabam se tornando inacessíveis para as classes sociais menos favorecidas (SOLLID; KHOSLA, 2005; GÉLINAS et al., 2008; CIACCI et al., 2015; SOARES, 2017)

Dentre os cereais que possuem glúten, um dos mais consumido no Brasil é o trigo sendo utilizado em diversos produtos de panificação que se encontram presentes na mesa dos brasileiros diariamente. Os produtos de panificação mais consumidos a base de trigo são os pães, bolos e biscoitos que contribuem com grande parte do aporte calórico diário (ARAÚJO et al., 2010).

As principais carências nutricionais dos portadores de DC são relacionadas a má absorção de micro e macro nutrientes (principalmente ferro, cálcio, B12 e ácido fólico) devido a problemas nas vilosidades do intestino causadas pela presença de glúten que é tóxica para estas pessoas. Outras deficiências nutricionais estão relacionadas à problemas de nutrientes alimentares que na sua maioria causam anemia por deficiência de ferro refratária ao tratamento, deficiência não explicada de ácido fólico e vitamina B12, problemas de osteopenia e portanto recomenda-se que todo paciente com DC tenha adequada ingestão de cálcio e vitamina D (ROSELL; MARCO, 2008; THEETHIRA; DENNIS, 2015; RESENDE et al, 2017); e a pouca oferta de produtos para celíacos existentes no mercado pode ocasionar em uma dieta pobre em ferro, cálcio, magnésio, zinco, vitamina D, ácido fólico, vitaminas do complexo B e fibras e rica em gorduras saturadas e açúcar, aumentando o risco nutricional e diminuindo a absorção de nutrientes importantes para o bom funcionamento do organismo ocasionando alto risco para doenças metabólicas (CASTRO et al., 2007; PREICHARDT et al., 2009; WILD et al., 2010; CIACCI et al., 2015; SOARES, 2017).

O monitoramento da adesão à dieta deverá ser avaliado periodicamente e incentivado em toda a consulta, pois é essencial para a recuperação nutricional e prevenção de complicações pelo consumo de glúten. A Tabela 1 é referente a lista dos principais alimentos proibidos e permitidos na alimentação da pessoa celíaca. A realização da sorologia (antitransglutaminase) após seis meses do

diagnóstico também é recomendada para verificação do seu declínio, adesão e resposta ao tratamento. A negatificação da sorologia deverá ocorrer após 12 meses. Caso não ocorra melhora clínica e/ou declínio da sorologia, deverá ser avaliada transgressão da dieta, DC refratária e avaliação dos diagnósticos diferenciais da doença, como alergia ao glúten, por exemplo. Posteriormente, nos pacientes assintomáticos, a sorologia deverá ser realizada anualmente além do seguimento clínico (RESENDE et al, 2017).

Tabela 1 - Lista dos alimentos permitidos e proibidos para portadores de DC

	Alimentos Permitidos	Alimentos Proibidos
Bebidas	Suco de frutas e vegetais naturais, chá, café não misturado à cevada com selo ABIC e refrigerantes. Vinhos, champanhe, aguardente e saquê.	Cerveja, uísque, vodca, gim. Ovomaltine, bebidas e preparações contendo malte. Café misturado com cevada. Bebidas com composição desconhecida.
Carnes, Peixes e Ovos	Todos in natura	Preparações à milanesa, hambúrguer, salsicha, patês, embutidos e enlatados. Verificar composição.
Gorduras, Óleos e Azeites	Manteiga, margarina, banha de porco, gordura vegetal hidrogenada, óleos vegetais, azeite.	Verificar composição.
Legumes, Hortaliças e Frutas	Todos	
Leites e Derivados	Leites integrais, semidesnatados e desnatados. Leite condensado e creme de leite. Queijos frescos (minas, ricota e parmesão). Iogurte e requeijão: verificar embalagem	Leites achocolatados que contenham malte ou extrato de malte, queijos fundidos ou preparados com cereais que contenham glúten. Verificar composição de queijos, iogurtes e requeijão.
Condimentos	Sal, pimenta, salsinha, ervas, temperos caseiros, maionese caseira, vinagre fermentado de vinho tinto e arroz, glutamato monossódico.	Mostarda, catchup, maionese e temperos industrializados podem conter glúten. Verificar composição.

Tabela 1 – Continuação

Cereais, Grãos, Tubérculos e Farinhas	Arroz, batata, milho e mandioca, feijão, ervilha, lentilha, amendoim, grão de bico e soja (extrato proteico de soja e extrato hidrossolúvel de soja). Farinha de arroz, creme de arroz. Fécula de batata. Fubá, amido de milho, canjica e pipoca. Tapioca, polvilho, farinha de mandioca. Macarrão de arroz, milho e mandioca.	Trigo, centeio, cevada, malte e aveia. Todos os produtos feitos com esses cereais (pães, biscoitos, massas e outros). Extrato proteico vegetal e proteína vegetal hidrolisada. Sempre conferir composição nas embalagens.
--	--	---

Fonte: www.acelbra.org.br (2020)

2.7. Métodos de identificação do glúten

De acordo com o CODEX ALIMENTARIUS os métodos considerados como padrão ouro para a determinação de glúten em alimentos são: métodos imunoenzimáticos (ELISA R5) e os métodos de DNA (CODEX, 2008). As gliadinas podem ser detectadas por espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta resolução, análise de DNA e métodos imunológicos. A técnica imunológica adotada na detecção de glúten atualmente é o método ELISA que pode ser do tipo R5 e ELISA γ -gliadina (VÁLDES et al., 2003; PIRES, 2013).

A técnica de ELISA R5 fundamenta-se na utilização de um anticorpo monoclonal que reconhece a sequência tóxica do pentapeptídeo ‘Glutamina-Glutamina-Prolina-Fenilalanina-Prolina’ (GGPFP) e detecta níveis de 1,50 ppm de gliadina ou 3 ppm de glúten, sendo que conteúdo de glúten no alimento é calculado levando-se em conta a estimativa de que 50% do glúten está sob a forma de gliadina (VALDES et al., 2003; CODEX ALIMENTARIUS, 2008; SILVA, 2010; AOAC, 2012). Sendo capaz de detectar glúten de diferentes variedades de trigo, centeio, aveia e cevada em produtos aquecidos ou não e não reage com as prolaminas do milho e arroz (OLIVEIRA, 2014).

Existem vários estudos realizados com kits comerciais ELISA R5. Os resultados demonstraram que a repetitividade e a reprodutibilidade dos kits foram aceitáveis para o teste de ELISA R5 e garantiram uma sensibilidade 1,5 ppm de gliadina em alimentos livres de glúten (PIRES, 2013).

As fitas imunocromatográficas são uma alternativa rápida e de fácil manuseio quando comparadas a técnica de ELISA. Seu limite de detecção é de 5 a 20 ppm, dependendo do fabricante. Essa análise é de fácil manuseio e

rapidez nos resultados (3 a 15 min), ausência de equipamentos caros como leitores de absorvância e centrífugas. Porém, a análise por fitas imunocromatográficas ainda não são validadas como padrão para presença ou não de glúten em amostras de alimentos devido apresentarem alguns resultados falso positivos, entretanto apresentam um grande potencial para análise de alimentos devido sua praticidade (LAUREANO, 2010).

O método de PCR (*Polimerase chain reaction*) serve para a discriminação específica de trigo, centeio, cevada e aveia em amostras alimentares, sendo que a sensibilidade deste método é comparável aos métodos imunológicos, com a vantagem que a PCR também discrimina entre diferentes espécies de cereais (TERZI et al., 2005, PIRES, 2013).

A técnica baseada na extração de DNA por PCR possui detecção de glúten que se baseia na estabilidade do DNA dos cereais mesmo após aquecimento. A reação funciona da seguinte forma, o DNA é extraído da amostra, submetido a vários ciclos de amplificação de um gene alvo em um termociclador para depois ser analisado em gel de agarose (DEBNATH, MARTIN; GOWDA, 2009). A análise de DNA apresenta excelente sensibilidade e especificidade e pode ser utilizada como método confirmatório dos testes ELISA (DAHINDEN, VON BÜREN; LÜTHY, 2001). Na área alimentar, o PCR já é utilizado na identificação de organismos geneticamente modificados e compostos alergênicos, além de possuir elevada sensibilidade e capacidade de detectar e amplificar quantidades pequenas de DNA desejado (BENITES, 2016).

Outro método bastante utilizado é a eletroforese em gel de poliacrilamida que consiste na separação de proteínas em um substrato em gel através da sua massa molecular, com aplicação de um campo elétrico. É um dos métodos de referência na análise de proteínas, porém possui uma abordagem bastante versátil que permite a análise de uma grande diversidade, tanto no tipo como na dimensão das proteínas, podendo estas estar na sua forma nativa ou reduzida, e podendo ser efetuada em condições ácidas, básicas ou neutras, e utilizando diferentes mecanismos de separação. Este método é simples e de baixo custo, porém a desvantagem é a demora em se concretizar uma sessão e as diversas etapas envolvidas na separação das proteínas (PITÉ, 2007).

Um dos métodos de eletroforese em gel mais comuns é o método de "Western blot". Nesse método, as proteínas são transferidas do gel para uma

membrana de nitrocelulose, onde são usados como sondas anticorpos específicos para proteínas. Esse método é bastante sensível podendo detectar pequenos componentes presentes nas amostras em misturas complexas. Na análise de glúten, o “Western blot” permite a detecção e tipificação das proteínas do glúten por comparação com marcadores de massa molecular existentes para o trigo, centeio, cevada e aveia, e a detecção e visualização tanto das várias frações de prolaminas como de prolaminas hidrolisadas (de massa molecular inferior). Esta técnica tem a vantagem de poder detectar falsos positivos e negativos obtidos nos métodos de ELISA, podendo também revelar quais as amostras que contêm prolaminas hidrolisadas sendo, no entanto, necessário quantificá-las utilizando o método competitivo (SMOLEC et al, 2005).

O glúten também pode ser detectado por espectrometria de massa que é um método analítico usado para medir massas químicas ou moleculares. Para análise de glúten tem sido utilizada a espectrometria de massa MALDI-TOF7 (dissorção/ionização mediante laser por uma matriz assistida acoplada a um detector de tempo de voo). Nesse tipo de espectrometria de massa os analitos misturam-se com uma matriz orgânica transformando-se em íons através da ação de um laser. Já no analisador de tempo de voo (TOF) os íons após terem sido acelerados no vácuo de campo elétrico, eles são separados de acordo com sua massa e carga. Esse método possui pontos positivos e negativos. Como pontos positivos o fato de ser uma análise rápida (alguns segundos), manuseia uma única amostra, determina a massa de prolamina com exatidão, possui uma interpretação de rotina relativamente simples e ideal para fazer a tipificação das proteínas. Os pontos negativos são: instrumentação complexa, equipamentos caros, técnica não quantitativa, necessita de uma grande instalação e precisa de uma prévia elaboração de livreria de espectro (DeSILVA et al, 2003).

2.8. Pesquisa com consumidores sobre produtos sem glúten

Segundo a Federação Nacional das Associações dos Celíacos do Brasil (FENACELBRA) nos últimos dez anos aumentou a consciência sobre a doença celíaca (que afeta aproximadamente dois milhões de brasileiros) e a sensibilidade ao glúten (que afeta 14 milhões de brasileiros, com efeitos mais brandos), sendo que a maioria ainda não possui um diagnóstico preciso sobre a doença nem a sensibilidade ao glúten. De acordo com estatísticas da federação

dos celíacos, estima-se que a cada 400 habitantes, um possui restrição ao glúten (FENACELBRA, 2015).

Com a preocupação cada vez maior por encontrar produtos para celíacos torna-se primordial conhecer as necessidades destes consumidores. Por isso, é relevante compreender a segurança dos produtos sem glúten e a facilidade em encontrar estes produtos. Nos últimos anos cada vez mais estudos vem pesquisando o perfil destes consumidores, a qualidade e confiabilidade destes produtos, preços e comparação sobre as qualidades sensoriais dos produtos sem glúten com os produtos convencionais.

O estudo de FALLAVENA, 2015 realizou a pesquisa sobre o “perfil do consumidor de produtos sem glúten: necessidade ou modismo?”, neste estudo ele realizou perguntas onde verificou o grau de conhecimento deste tema pelos consumidores de produtos sem glúten. Foi aplicado um questionário com 14 questões com 450 entrevistados. Através da análise dos dados obtidos, o autor observou que a maioria dos entrevistados consome regularmente produtos sem glúten ou faz alguma dieta com restrição de glúten, sendo a maioria dos entrevistados mulheres com faixa etária de 31 a 59 anos e grau escolar variando de superior incompleto à pós-graduação (incompleta ou completa). Desses, a maioria era composta por celíacos, sendo estes diagnosticados por exames médicos. Porém, uma parcela significativa (21,54%) tem diagnóstico incerto ocasionado pela ausência de exames conclusivos. Cerca de metade dos entrevistados não conheciam todas as doenças relacionadas ao glúten. Os principais veículos de informação relatados foram Sites sobre Saúde, Blogs e Livros (47,74%). A maioria (219 entrevistados) respondeu saber o que é glúten. Surpreendentemente, 34 pessoas celíacas ou com sensibilidade ao glúten relataram ainda continuar consumindo produtos com glúten, sendo os principais produtos relatados pães e massas. Esses, por sua vez, também foram os principais produtos relatados como sendo substituídos por produtos sem glúten. O principal efeito relatado da troca da dieta por alimentos sem glúten foi pela melhora dos problemas gastrointestinais e metade dos entrevistados demonstrou acreditar que os produtos sem glúten sejam melhores para a saúde humana como um todo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na Universidade Federal de Pelotas (UFPEl) sendo dividido nas seguintes etapas: desenvolvimento e aplicação de questionário online sobre produtos sem glúten; escolha dos tipos de produtos de panificação; aquisição das amostras e kit de análises; processamento das amostras; análise laboratorial das amostras e análise estatística dos dados.

Nas diferentes etapas da análise foram utilizados os laboratórios da UFPEL de Análise Sensorial de Alimentos e Biologia Molecular ambos situados no Campus Capão do Leão. E o laboratório de Nutrição e Dietética e Farmácia no Centro Universitário da Região da Campanha/RS (URCAMP), onde realizamos um estudo piloto para entender melhor a metodologia.

3.1. MATERIAIS

- Kit de análise de ELISA R5 e de fitas imunocromatograficas - RIDASCREEN® da R-Biopharm AG;
- Estufa de secagem;
- Grau e pistilo;
- Liquidificador;
- Peneira;
- Solução de Álcool 60%;
- Solução de Álcool 80%;
- Espectrofotômetro de placa de micro titulação EZ Read 400 – Biochrom;
- Centrífuga KR600 – Kubota;
- Solução Cocktail (patenteada) - R-Biopharm AG;
- Eppendorfs;
- Tubos de falcon;
- Pipetas;
- Vórtex XH- DU Vortex- Global Trade Technology;
- Amostras;
- Água destilada.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Questionário de avaliação do consumo de produtos sem glúten

Buscou-se através deste estudo observar quais são as pessoas que estão aderindo à dieta sem glúten, visto que a adesão a dieta pode estar associada a um aumento de pessoas consideradas celíacas, também buscamos saber qual o conhecimento destas pessoas sobre o glúten e os produtos sem glúten. O questionário foi respondido por 115 pessoas ficando online durante o período de 26/08/2019 até 24/12/2019. Utilizamos a plataforma do Google forms para realizar o questionário, também distribuimos o link do questionário em grupos de pessoas celíacas da cidade de Pelotas e região através das redes sociais visando alcançar o maior número de pessoas possíveis.

Utilizou-se este questionário também para avaliar quais os produtos mais consumidos por este público para nos auxiliar quais seriam os produtos testados nas análises. As respostas foram avaliadas de forma a observar as tendências de pensamento em relação ao conhecimento sobre o glúten, produtos sem glúten e consumo destes produtos, assim como avaliação sensorial destes produtos de panificação isentos de glúten, também servirá para delinear um perfil para o consumidor de produtos sem glúten. Utilizamos o teste sensorial afetivo qualitativo de análise individual (One-on-One interviews). As questões do questionário aplicado encontram-se no anexo A.

3.2.2. Determinação dos alimentos analisados

Através da aplicação do questionário online sobre produtos sem glúten, os principais produtos consumidos por eles e os que eles acreditam não serem confiáveis sobre a isenção de glúten na formulação, definimos os produtos a serem analisados. Foram analisadas amostras de produtos de panificação rotulados como “não contém glúten” e alimentos “naturalmente livres de glúten”, estes foram adquiridos aleatoriamente em estabelecimentos comerciais do município.

Após a coleta dos dados do questionário, os produtos analisados foram: pães, biscoitos/bolachas, mistura para bolos, mistura para pães, mistura para pão de queijo, massa de arroz, fécula de mandioca (tapioca), granola sem glúten, farinha de arroz, fermento químico para bolo, sendo analisados pelo menos 2

amostras de marcas diferentes e em duplicata. Para garantir a eficácia dos kits de análises usamos como amostra padrão a farinha de trigo.

3.2.3. Preparo das amostras

O processamento das amostras foi realizado logo após a compra, nos Laboratórios da Universidade Federal de Pelotas. Todas as bancadas, superfícies, equipamentos e utensílios necessários para essa etapa foram higienizados com água destilada e detergente comum, e com solução de etanol 70% para evitar qualquer tipo de contaminação por glúten decorrente do ambiente laboratorial.

As amostras foram preparadas conforme descrição pela instrução do fabricante dos kits de ELISA R5 e de Fitas imunocromatográficas ambas da marca RIDASCREEN® da R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemanha). Os kits para as análises foram adquiridos com recursos próprios.

3.2.4. Extração das amostras e análise por ensaio imunoenzimático (ELISA R5)

A homogeneização das amostras foi realizada em uma sala isolada ao local que foi realizada a análise de ELISA R5 e das Fitas imunocromatográficas, para evitar possíveis contaminações por pequenas partículas e poeira de cereais suspensas no ar e nos equipamentos. As análises foram realizadas em dois dias por isso, obteve-se mais de uma curva padrão.

Depois do preparo das amostras de acordo com a metodologia da RIDASCREEN® Gliadina (R7001). Todas as amostras serão extraídas com a solução Cocktail (patenteada) (R7006/R7016, método oficial R5-Mendez) para alimentos declarados sem glúten. Realizou-se a homogeneização na capela devido à β -mercaptoetanol, presente na solução cocktail (patenteada), depois de peneiradas e pesadas as amostras foram extraídas com a solução de cocktail diluída pelo menos na proporção 1:500 (recomendação 1:500 para amostras com aproximadamente 20 mg/kg de glúten e 1:2500 para amostras com aproximadamente 100 mg/kg de glúten).

O kit R5 ELISA RIDASCREEN® Gliadin possui todos os reagentes necessários para o ensaio imunoenzimático incluindo os padrões (calibrados para prolaminas), cada kit serve para até 96 determinações. Possui limite de

detecção: 0,5 mg/kg (ppm) de gliadina ou 1 mg/kg (ppm) de glúten (dependendo da matriz utilizada) e limite de quantificação: 2,5 mg/kg (ppm) de gliadina ou 5 mg/kg (ppm) de glúten.

O anticorpo monoclonal R5 reage com a gliadina para frações de trigo e prolaminas correspondentes de centeio e cevada. Basicamente o anticorpo monoclonal reconhece a sequência tóxica do pentapeptídeo 'Glutamina-Glutamina-Prolina-Fenilalanina-Prolina' e possui limites de detecção de acordo com o que o CODEX ALIMENTARIUS preconiza que deve ter pelo menos 10 ppm como limite de detecção.

A extração das amostras e preparo das soluções ocorreu de acordo com as seguintes etapas:

1- Pesou-se uma quantidade suficiente (pelo menos 5 g) de amostra dos produtos analisados;

2- Para as amostras contendo cacau e especiarias adicionou-se 0,25 g de leite em pó desnatado, conforme indicado pelo fabricante do kit;

3- Para que as amostras cheguem a consistência de pó foi necessário secar em estufa para remover a água presente nos alimentos e facilitar a moagem (estufa por 2 – 6 h a 250 °C);

4- Foi feita a moagem completa das partículas até que estas obtivessem consistência de pó, se necessário foi utilizado uma peneira;

5- Após pesou-se 0,25 g da amostra (balança analítica) em um tubo de falcon de 15 mL e adicionou-se 2,5 mL da solução Cocktail (patenteada) na capela misturando bem;

6- Deixou-se a amostra descansando por 40 min a 50 °C na estufa;

7- Depois a amostra ficou sob temperatura ambiente e após adicionou-se 7,5 mL de etanol 80%;

8- O frasco foi fechado e homogeneizou-se em centrífuga por 10 min a 2500 rpm na temperatura ambiente (20 – 25 °C), após deixou-se o frasco descansando durante 1 h;

9- Após a centrifugação filtrou-se o extrato, se necessário (aproximadamente 2 mL do extrato);

10- Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de falcon de 15 mL;

11- Logo em seguida preparou-se a diluição da solução buffer (tampão) que foi feita na proporção 1:5 (1 + 4) com água destilada (por exemplo, 3 mL de

concentrado + 12 mL de água destilada, suficiente para a diluição de 10 amostras);

12- Após preparou-se a diluição da solução conjugada (frasco com tampa vermelha). Para reconstituição, o concentrado da solução conjugada foi diluído na proporção 1:11 (1 + 10) com água destilada (por exemplo, 200 mL de concentrado + 2 mL de água destilada);

13- Depois preparou-se a solução tampão de lavagem. Que foi diluída na proporção 1:10 (1 + 9) com água destilada (100 mL de concentrado de tampão de lavagem + 900 mL de água destilada). Antes da diluição, se necessário dissolver os cristais eventualmente formados e incubar a solução tampão em banho-maria a 37°C.

Após todas as soluções prontas prosseguimos para a análise de ELISA R5 conforme descrito o passo a passo de cada etapa:

1- Utilizou-se o número suficiente de micro-poços para todos os padrões e amostras a serem executados em duplicata. Anotou-se as posições do padrão e das amostras (transferiu-se as amostras para eppendofs em duplicata);

2- Adicionou-se 100 µL de cada solução padrão (padrão 1-6) nos micro-poços e 100 µL de cada amostra e incubou-se em lugar protegido da luz durante 30 min à temperatura ambiente (20 – 25 °C);

3- Após lavou-se a placa virando-a placa com os micro-poços para que o líquido presente nos poços seja eliminado com batidas leves no suporte da placa (três vezes) contra uma folha de papel absorvente para garantir a remoção completa do líquido dos micro-poços;

4- Após esta etapa adicionou-se 250 µL de solução tampão de lavagem já diluída nos micro-poços, repetiu-se o processo anterior de lavagem e todo esse processo foi repetido mais duas vezes;

5- Realizou-se a primeira lavagem adicionando 100 µL da solução conjugada já diluída nos micro-poços, incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente (20 – 25 °C) no escuro;

6- Após realizou-se a segunda lavagem, adicionou-se em todos os micro-poços 250 µL de solução buffer já diluída e repetiu-se o processo de lavagem como descrito anteriormente mais duas vezes;

7- Após realizou-se a terceira lavagem adicionando 50 µL de substrato e 50 µL de cromogênio (responsável pela coloração nos micro-poços) em cada

micro-poço. Agitou-se suavemente a placa manualmente e incubou-se por 30 min em temperatura ambiente (20 - 25 °C) no escuro;

8- E por fim adicionou-se 100 µl da solução de parada em cada micro-poço. Novamente misturou-se suavemente agitando a placa manualmente e após 30 minutos realizou-se a leitura da absorbância a 450 nm no espectrofotômetro para leitor de micro-poços.

Para facilitar o entendimento das diversas etapas do método de análise de ELISA R5, utilizou-se o esquema simplificado. A Figura 4 é referente ao esquema simplificado para análise imunoenzimática de ELISA R5.

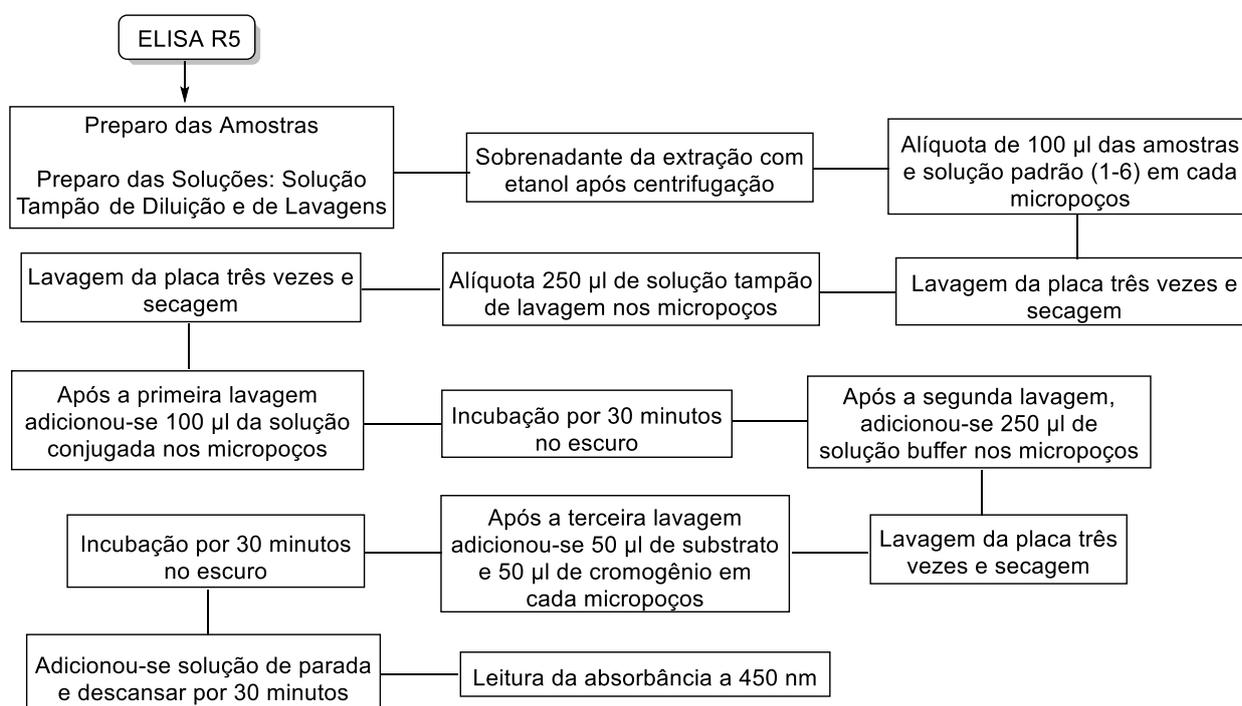


Figura 4 - Figura referente ao esquema simplificado para análise imunoenzimática de ELISA R5.

3.2.5. Análise por fitas imunocromatográficas

As análises por fitas imunocromatográficas foram realizadas em setembro de 2020 no Campus Capão do Leão, no laboratório de Análise Sensorial. Realizamos a análise conforme a descrição do fabricante. Foi utilizado o kit da RIDA®QUICK da R-BIOPHARM®, que é um teste imunocromatográfico para a detecção qualitativa de contaminação por glúten. O kit de teste é composto de 25 tiras (e 25 tubos para determinações).

Após o tempo determinado de espera da análise verificamos visualmente os resultados nas fitas. Para resultado negativo apenas uma banda foi vista (banda controle) e para resultado positivo duas bandas foram vistas (bandas controle e teste).

As tiras também usam o anticorpo R5 e mostram uma boa correlação com o método de ELISA R5. O anticorpo monoclonal R5 reage com a fração de gliadina do trigo e as prolaminas correspondentes de centeio e cevada.

Para esta análise foi utilizado 50 μ L (0,05 mL ou 3 gotas) do sobrenadante resultante da extração da amostra que foi adicionado a 500 μ L (0,5 mL) de tampão de diluição no tubo de ensaio, após agitou-se com vórtex para homogeneizar a solução.

Preparamos a amostra conforme a descrição de preparo para matéria-prima sólida e dura:

1- Primeiramente pesou-se 5 g de amostra e moemos até consistência de pó;

2- Utilizou-se 1 g deste pó e adicionamos 10 mL de solução de etanol 60% (para amostras contendo soja adicionamos 1 g de leite em pó desnatado);

3- Agitou-se bem por pelo menos 30 segundos no vórtice;

4- Deixou-se a amostra filtrando em papel filtro e utilizou-se somente o sobrenadante;

5- Colocou-se a fita-teste dentro do tubo de ensaio (cuidando para não mergulhar a tira além da linha máxima) contendo a solução e depois de 5 minutos realizou-se a leitura.

Observou-se os resultados visualmente, comparando com o cartão de avaliação presente no kit. Em caso de resultado negativo apenas uma banda foi vista (banda controle azul), em caso de resultado positivo, duas bandas foram vistas na fita imunocromatográfica (banda controle azul e banda teste) e o resultado será considerado inválido quando não apresentar nenhuma banda colorida.

Para facilitar o entendimento do método de análise das fitas imunocromatográficas, utilizou-se o esquema simplificado. A Figura 5 é referente ao esquema simplificado para análise das fitas imunocromatográficas.

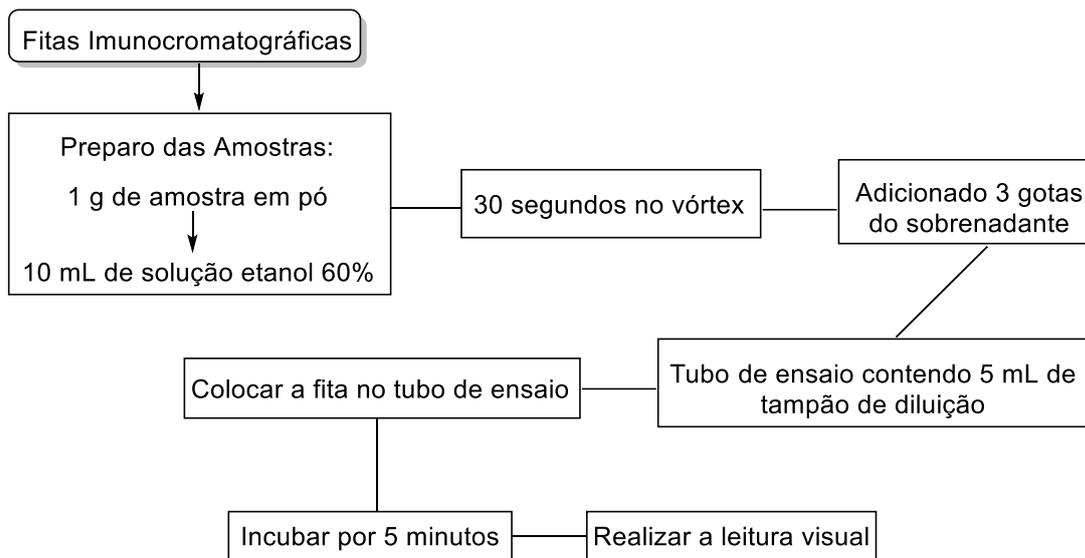


Figura 5 - Figura referente ao esquema simplificado para análise das fitas imunocromatográficas.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises foram digitados em uma tabela do programa *Excel*® para ser realizada a análise de média e desvio padrão. A comparação das médias foi realizada por análise de variância através do programa STATA versão 12.1 (ANOVA) e pelo teste de significância de Tukey ($p < 0,05$) e análises multivariadas.

5. RESULTADOS

5.1. Questionário de avaliação do consumo de produtos sem glúten

Foi aplicado um questionário online de múltiplas questões para avaliar o conhecimento de pessoas celíacas ou que consomem dieta com restrição de glúten. Obteve-se as respostas e analisou-se o conhecimento dos participantes sobre o glúten, os produtos sem glúten, sintomas da DC e consumo destes produtos.

Após o encerramento do questionário analisamos os dados e observamos que a maioria das pessoas que responderam ao questionário, 88,7% são mulheres, 44% dos participantes possuem idade acima dos 40 anos, praticamente 42% possuem pós-graduação. Os participantes foram perguntados sobre o que é glúten e todos (100%) responderam saber o que é glúten, praticamente 81% dos participantes consomem produtos de panificação sem glúten, 54% consomem diariamente esses produtos e 92% seguem dieta sem glúten. Quando perguntados sobre a doença celíaca 93% possuem alguma enfermidade relacionada ao glúten, 51% relataram encontrar com facilidade produtos sem glúten, porém 40% não se sentem seguros quando ao consumo destes produtos e 50,4% relataram que sua maior dificuldade é realizar as refeições fora de casa.

Também questionamos com perguntas dissertativas sobre o que eles sabiam sobre as enfermidades que o glúten pode causar, quais os produtos de panificação sem glúten mais consumidos, se ainda consumiam algum produto de panificação com glúten e se os produtos de panificação sem glúten possuem benefícios para a nossa saúde. O produto mais consumido foi o pão com 27,2% das respostas, 5,3% dos respondentes acham que celíacos podem consumir produtos com glúten, 78,1% acreditam que os produtos sem glúten trazem benefícios para saúde e 12,3% não souberam responder.

Perguntamos também sobre a dieta alimentar dos participantes, 80,9% relataram que consomem produtos sem glúten devido a doença celíaca, 66% relataram que houve melhora nos problemas digestivos após a substituição dos alimentos com glúten para alimentos em glúten, 41% dos participantes relataram que a principal diferença dos produtos de panificação sem glúten comparados com os produtos que possuem glúten é a textura que estes produtos apresentam

seguido pelo preço elevado, em que 40% relataram como uma das principais diferenças. Para os respondentes o principal motivo da troca de alimentos com glúten por sem glúten é a melhora de problemas de saúde (65,8%), seguido por perda ou ganho de peso (15,8%) e as diferenças encontradas nessa troca de produtos foi o preço (40,4%), a textura (37,7%), o sabor (21,1%) e a cor (0,8%).

As respostas do questionário estão descritas abaixo de acordo com as figuras de 6 – 20. Porém, com exceção das perguntas dissertativas que foram analisadas resposta por resposta sendo evidenciada somente as mais citadas.

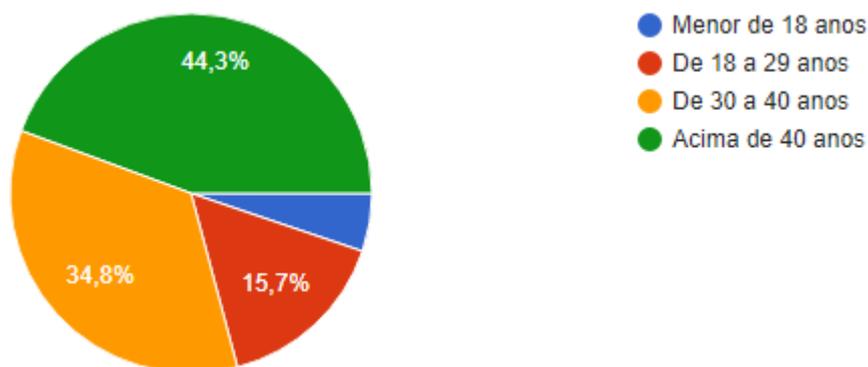


Figura 6 - Gráfico referente a faixa etária dos participantes.

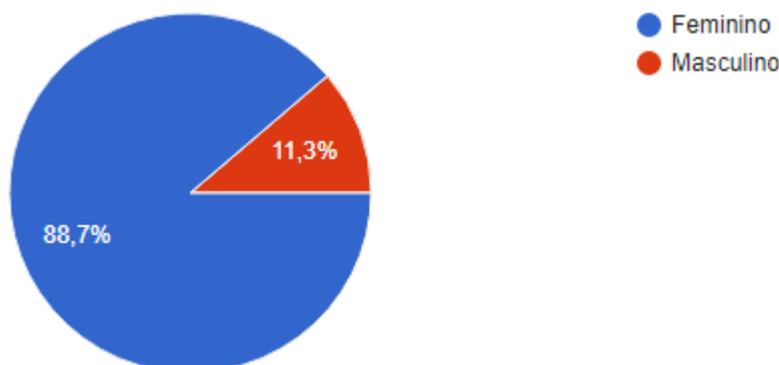


Figura 7 - Gráfico referente ao sexo dos participantes.

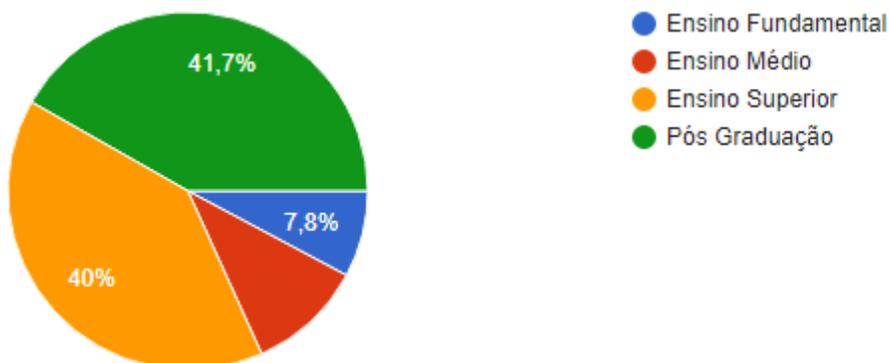


Figura 8 - Gráfico referente a escolaridade dos participantes.

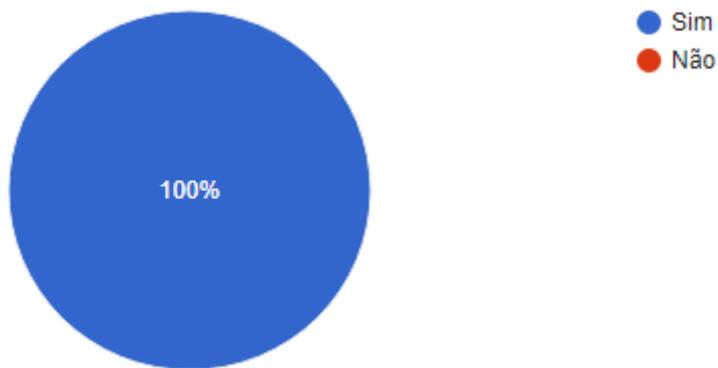


Figura 9 - Gráfico referente a pergunta o que é glúten?

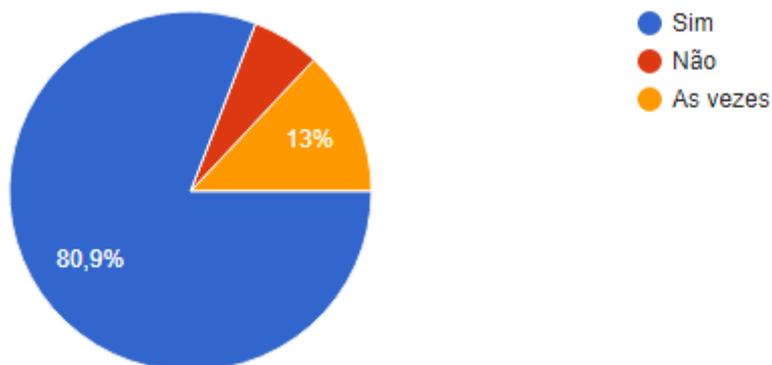


Figura 10 - Gráfico referente ao consumo de produtos de panificação sem glúten.

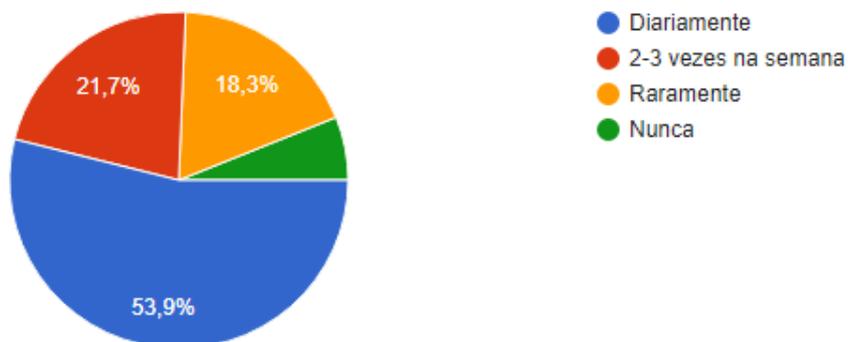


Figura 11 - Gráfico referente a frequência de consumo de produtos de panificação sem glúten.

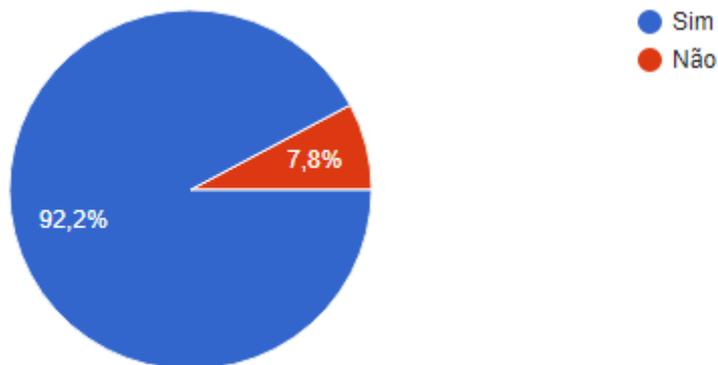


Figura 12 - Gráfico referente a realizar algum tipo de dieta com restrição de glúten.

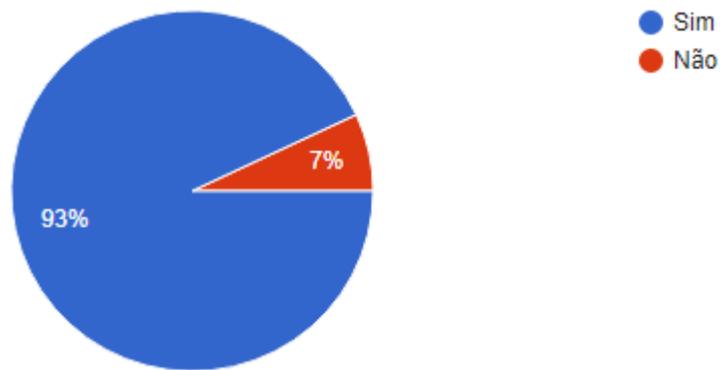


Figura 13 - Gráfico referente a possuir alguma enfermidade com relação ao glúten.

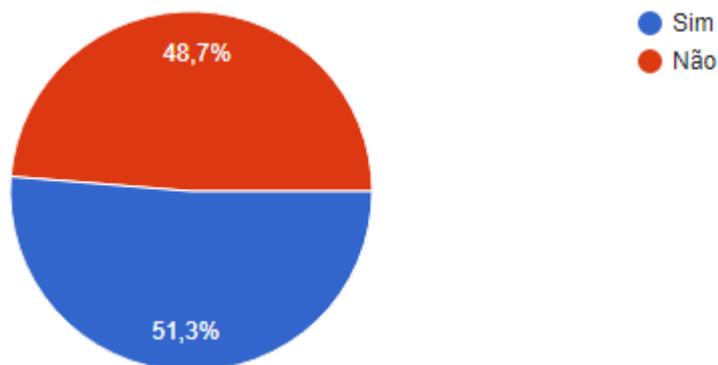


Figura 14 - Gráfico referente a encontrar produtos sem glúten com facilidade.

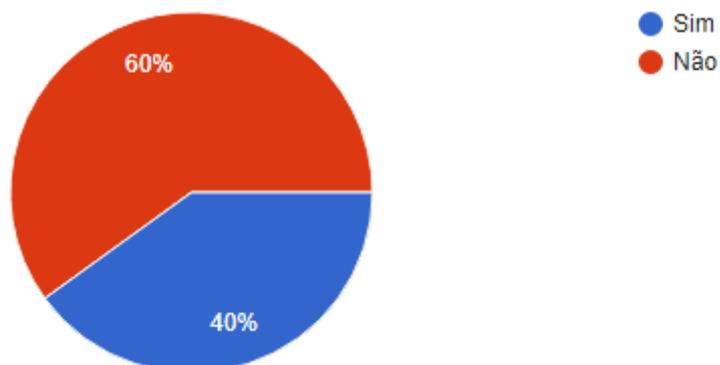


Figura 15 - Gráfico referente a consumir produtos sem glúten serem seguros para o consumo.

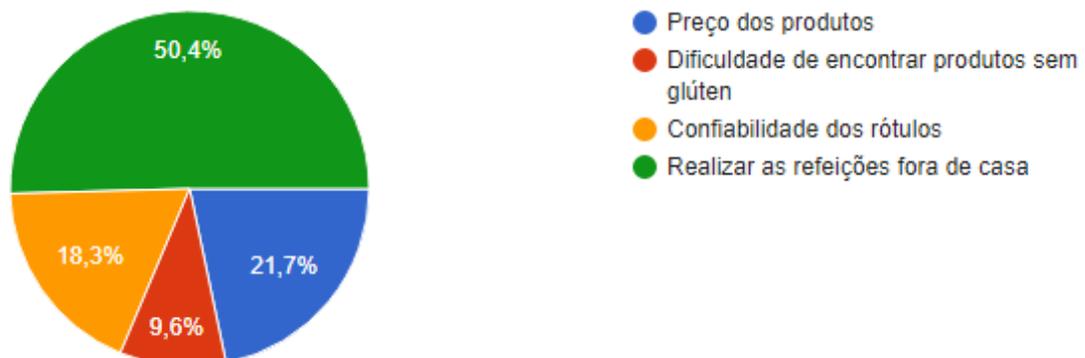


Figura 16 - Gráfico referente às maiores dificuldades com relação às restrições da alimentação sem glúten.

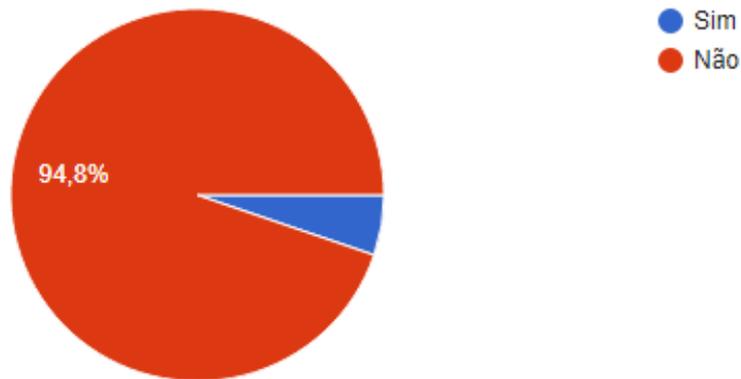


Figura 17 - Gráfico referente ao consumo de produtos de panificação que contenham glúten por participantes celíacos.

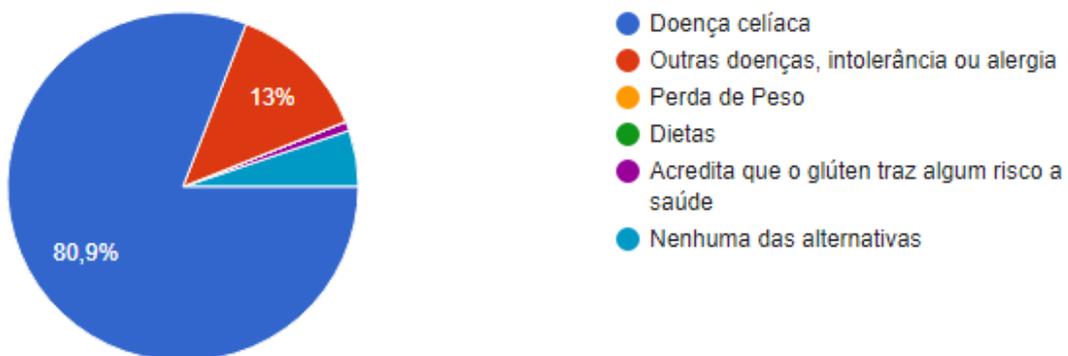


Figura 18 - Gráfico referente ao motivo que levou os participantes ao consumo de produtos sem glúten.

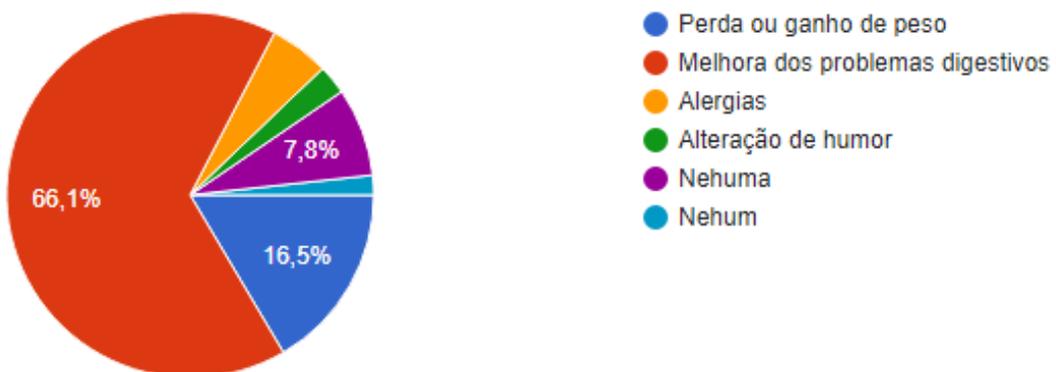


Figura 19 - Gráfico referente a diferença ou alteração na saúde ao trocar produtos com glúten por produtos sem glúten.

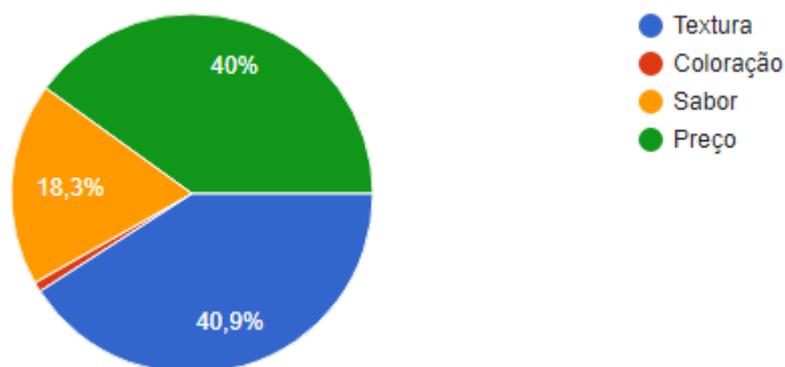


Figura 20 - Gráfico referente a diferença entre os produtos com glúten e sem glúten.

Todos os dados do questionário foram analisados estatisticamente e avaliados se apresentaram significância entre eles, porém, no presente trabalho somente são apresentadas discussão das variáveis que apresentaram significância estatística. No apêndice B está descrito todas as variáveis geradas e tratadas estatisticamente por ANOVA. Podemos verificar que quando analisadas as variáveis escolaridade x dificuldade de encontrar produtos sem glúten e escolaridade x dificuldades que estas apresentaram significância estatística ($p < 5$), as demais variáveis analisadas não apresentaram significância estatística.

As Tabelas 2 - 4 são referentes as análises estatísticas. Como descrito anteriormente somente a variável escolaridade apresentou significância estatística, apresentou desvio padrão de 0,905 e no programa estatístico foi considerado somente 114 respostas, uma das respostas foi considerada inválida. A Tabela 3 é referente a análise da variância da variável escolaridade, onde observamos 113 respostas válidas e intervalo de confiança de 0,376 e a Tabela 4 analisa a soma dos quadrados da variável escolaridade, somente duas das variáveis analisadas apresentaram intervalo de confiança significativo.

Podemos dizer que quando comparamos a variável escolaridade frente a facilidade e também a dificuldade de encontrar produtos em glúten estas variáveis se mostraram significativa, ou seja quanto maior ou menor a escolaridade, ela tem influência na escolha do lugar e para comprar os produtos sem glúten, assim como ainda é um ramo do mercado que é pouco explorado, e relatado por muitos se torna muitas vezes sendo mais localizado na parte central da cidade ou em lojas mais específicas de produtos naturais ou de suplementos.

Tabela 2 - Estatísticas descritivas (Dados quantitativos):

Variável	Observações	Obs. com dados faltantes	Obs. sem dados faltantes	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Escolaridade	114	0	114	1,000	4,000	3,149	0,905

Tabela 3 - Análise da variância (Escolaridade):

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Modelo	37	31,936	0,863	1,084	0,376
Erro	76	60,529	0,796		
Total corrigido	113	92,465			

Tabela 4 - Análise da Soma de Quadrados da variável Escolaridade:

Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Você sabe o que é GLÚTEN?	0	0,000			
Costuma consumir produtos S/G	0	0,000			
Frequência do consumo	3	4,395	1,465	1,840	0,147
Dieta S/G	1	2,489	2,489	3,125	0,081
Enfermidade ao GLÚTEN	1	0,003	0,003	0,004	0,950
a) Encontra produtos S/G com facilidade:	1	3,308	3,308	4,153	0,045
b) Seguro ao consumo S/G	1	1,199	1,199	1,505	0,224
c) Dificuldades	3	9,319	3,106	3,900	0,012
Enfermidades ao GLÚTEN?	1	0,041	0,041	0,051	0,821
Celiaco consome produtos com GLÚTEN:	1	1,018	1,018	1,278	0,262
Consome produto SEM GLÚTEN.	7	4,007	0,572	0,719	0,656
Produtos + consome C/G	6	1,628	0,271	0,341	0,913
Motivo produtos S/GLÚTEN:	3	1,146	0,382	0,480	0,697
Benefícios p/ saúde produtos S/G	2	0,438	0,219	0,275	0,760
Troca alimentos C/G por S/G	4	1,752	0,438	0,550	0,700
Diferença consumo S/G e C/G	3	1,195	0,398	0,500	0,683

ARAÚJO et al, (2010) ressaltam que o seguimento de uma dieta isenta de glúten interfere drasticamente no estilo de vida dos celíacos e, muitas vezes, para não se privarem de frequentar serviços de alimentação, viagens, convívio com parentes e amigos, por exemplo, acabam seguindo a dieta dita normal, que tem menor impacto social. Ainda segundo o autor no Brasil, com o objetivo de minimizar as dificuldades da adesão ao tratamento, surgiram as Associações de Celíacos, sendo que a primeira associação de celíacos criada foi a ACELBRA (São Paulo) fundada em fevereiro de 1994, que busca orientar os pacientes quanto à doença e à dieta sem glúten e divulgar a doença.

ARAÚJO et al, (2010) já relatava problemas com a atual legislação em vigor para produtos sem glúten, a Lei nº 8.543 da vigilância sanitária, que obriga as indústrias alimentícias a imprimirem em caracteres destacados uma advertência nos rótulos e nas embalagens de produtos industrializados que contêm glúten ou seus derivados. Em 2003, foi publicada a Lei nº 10.674, que obriga os produtos alimentícios comercializados a portarem informação sobre a presença de glúten como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Assim, todos os alimentos industrializados devem conter em seu rótulo, obrigatoriamente, as inscrições “contém glúten” ou “não contém glúten”, conforme o caso.

PRATESI (2019), avaliou com um questionário a qualidade de vida dos celíacos, sendo utilizado um questionário adaptado culturalmente e validado conforme o questionário “celiac disease quality of life questionnaire” originalmente desenvolvido na Alemanha. O questionário foi aplicado em 450 pacientes celíacos de 18 estados brasileiros, com duração de 2 semanas e composto por 28 perguntas de múltipla escolha. Após a coleta de dados a autora observou que o questionário brasileiro de qualidade de vida apresentou medidas válidas de reprodutibilidade e consistência interna. Foi possível observar a correlação positiva entre maior nível de escolaridade e melhor qualidade de vida. Os pacientes com DC que seguiam rígida dieta sem glúten apresentaram os maiores valores na escala de qualidade de vida, o diagnóstico tardio está relacionado a um pior escore de avaliação de qualidade de vida. Contudo observou-se que o tempo de diagnóstico, o nível de escolaridade superior, a adesão estrita à dieta sem glúten e o gênero masculino foram os que apresentaram melhores resultados neste questionário e estão relacionados aos maiores escores de qualidade de vida dos celíacos. O conhecimento da dieta e de qualidade de vida é importante para ajudar a implementar estratégias eficazes para melhorar a vida dos pacientes celíacos brasileiros e reduzir a carga física, emocional e social sobre eles.

5.2. Análise por ensaio Imunoenzimático (ELISA R5)

Os testes de ELISA R5 foram realizados no laboratório de Biologia molecular no centro de Biotecnologia no Campus Capão do Leão. Após a coleta dos dados estes foram enviados para RIDASCREEN® da R-Biopharm AG, para a realização da leitura no software específico para a análise, os resultados foram recebidos em abril de 2020.

O teste possui limite de detecção de: 0,5 mg/kg (ppm) de gliadina ou 1 mg/kg (ppm) de glúten (dependendo da matriz utilizada) e limite de quantificação: 2,5 mg/kg (ppm) de gliadina ou 5 mg/kg (ppm) de glúten. As mostras foram codificadas, conforme a Tabela 5 para facilitar e evitar qualquer vínculo com as marcas utilizadas durante a realização das análises.

Tabela 5 - Codificação das amostras

Código	Produto
11	Cookies chocolate marca A - 100g
12	Biscoito salgado queijo e linhaça marca B - 75g
13	Biscoito salgado quinoa com tomate marca C - 25g
21	Brownie de chocolate marca D- 40g
31	Granola sem glúten marca A- 200g
41	Mistura para pão de Queijo marca E - 250g
42	Mistura para pão de Queijo marca F - 250g
51	Massa de arroz marca G - 200g
61	Farinha de arroz marca H -1 Kg
62	Mistura multigrãos para pão marca H - 310g
71	Mistura para bolo de laranja marca I - 300g
72	Mistura para bolo de chocolate marca J - 300g
81	Bolo de laranja marca A- 200g
91	Pão tradicional sem glúten marca K - 170g
100	Massa para tapioca marca L - 70g
110	Fermento para bolo marca M - 100g
120	Rosquinha de polvilho com batata doce marca N - 50g
200 (C)	Farinha de trigo marca O - 1Kg (Amostra Controle)

Esses resultados estão dispostos conforme a distribuição das amostras nos micropoços da placa de ensaio imunoenzimático do teste ELISA R5. Todos os resultados apresentaram resultado negativo para concentração de glúten, ou seja, apresentaram resultados < de 2,5 mg/kg (ppm) de gliadina e < 5 mg/kg (ppm) de glúten. A única amostra que apresentou resultado positivo foi a amostra controle, que obrigatoriamente teria que possuir glúten na sua composição. No entanto quando observamos a absorvância dos resultados podemos perceber que algumas amostras apresentaram absorvância elevada o que poderia indicar a presença de traços de glúten em algumas das amostras analisadas, lembrando que segundo a legislação brasileira não especifica a quantidade de ppm de glúten que contém no produto.

As tabelas 6 - 10 são referentes as concentrações, a absorvância e aos resultados das análises imunoenzimáticas de ELISA. O gráfico 1 e 2 demonstram a concentração x absorvância dos resultados após a leitura no

espectrofotômetro. A primeira etapa da análise foi realizada em outubro de 2019 e a segunda etapa da análise foi realizada em janeiro de 2020.

Tabela 6 - Concentração e Absorbância das Concentrações Padrão (Standards) 1ª dia

Amostras Padrão (fornecida pelo kit)	Concentração ng/mL	Absorbância	Concentração (%)
1	0,00	0,002E	0,2
2	5,00	0,168E	15,2
3	10,00	0,310E	28,0
4	20,00	0,508E	45,9
5	40,00	0,834E	75,3
6	80,00	1,107E	100,0

Tabela 7 - Resultados das Amostras da 1ª dia

Amostras	Absorbância (média da duplicata)	Concentração (%)	Concentração calculada ng/mL	Gliadina mg/Kg	Glúten mg/Kg	Concentração glúten calculada a partir da curva padrão
72	0,011E	1,0	<5,00	<2,50	<5,00	-10,176
61	0,025E	2,3	<5,00	<2,50	<5,00	-9,1
62	0,003E	0,3	<5,00	<2,50	<5,00	-10,792
12	0,002E	0,2	<5,00	<2,50	<5,00	-10,869
13	0,007E	0,6	<5,00	<2,50	<5,00	-10,484
81	0,013E	1,2	<5,00	<2,50	<5,00	-10,023

Cálculo referente a equação da curva padrão de gliadina

Após a obtenção dos resultados, utilizou-se o gráfico da curva padrão x absorbância para gerar a equação da curva padrão de gliadina, conforme o cálculo abaixo (este cálculo foi repetido para todas as amostras):

$$y = 0,0134x + 0,1433$$

$$0,011 = 0,013x + 0,1433$$

$$0,011 - 0,1433 = 0,013x$$

$$-0,1323 = 0,013x$$

$$X = -0,01323 / 0,013$$

$$X = -10,176$$

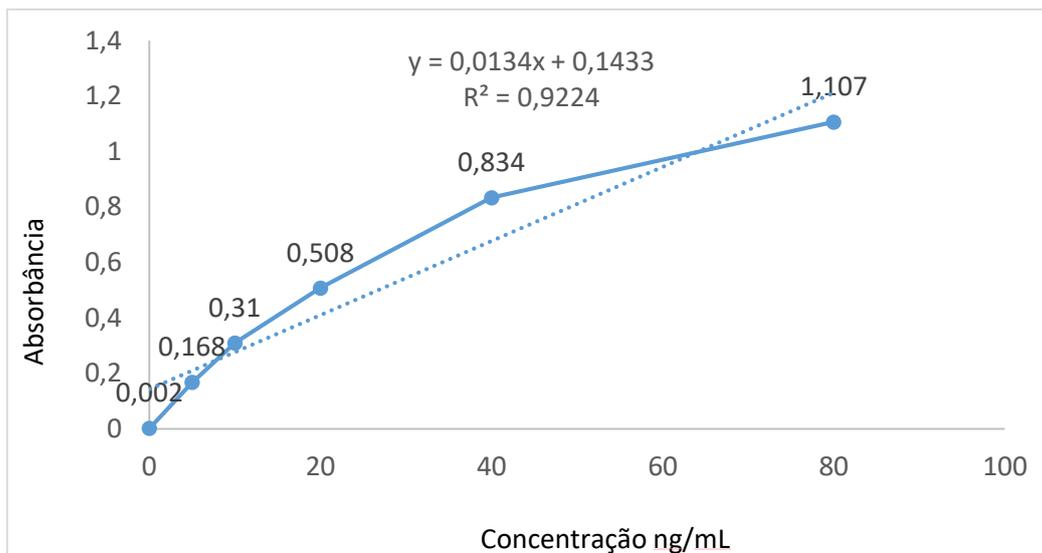


Gráfico 1 - Concentração x absorbância das amostras da 1ª dia.

Tabela 8 - Concentração e Absorbância das Concentrações Padrão da 2ª dia.

Amostras Padrão (fornecida pelo kit)	Concentração ng/mL	Absorbância	Concentração (%)
1	0,00	0,388E	40,0
2	5,00	0,177E	18,2
3	10,00	0,304E	31,3
4	20,00	0,504E	45,9
5	40,00	0,800E	82,5
6	80,00	0,970E	100,0

Tabela 9 - Resultados das Amostras da 2ª dia

Amostras	Absorbância (média da duplicata)	Concentração (%)	Concentração calculada ng/mL	Gliadina mg/Kg	Glúten mg/Kg	Concentração glúten calculada a partir da curva padrão
200	1,243E	128,1	>80,00	>40,00	>80,00	84,592
71	0,025E	2,6	<5,00	<2,50	<5,00	-9,1
100	0,056E	5,8	<5,00	<2,50	<5,00	-6,715
31	0,056E	5,8	<5,00	<2,50	<5,00	-6,715
51	0,003E	0,3	<5,00	<2,50	<5,00	-10,792
110	0,006E	0,6	<5,00	<2,50	<5,00	-10,561
120	0,006E	0,6	<5,00	<2,50	<5,00	-10,561
11	0,017E	1,8	<5,00	<2,50	<5,00	-9,715
41	0,032E	3,3	<5,00	<2,50	<5,00	-8,561
42	0,036E	3,7	<5,00	<2,50	<5,00	-8,253
91	0,017E	1,8	<5,00	<2,50	<5,00	-9,715

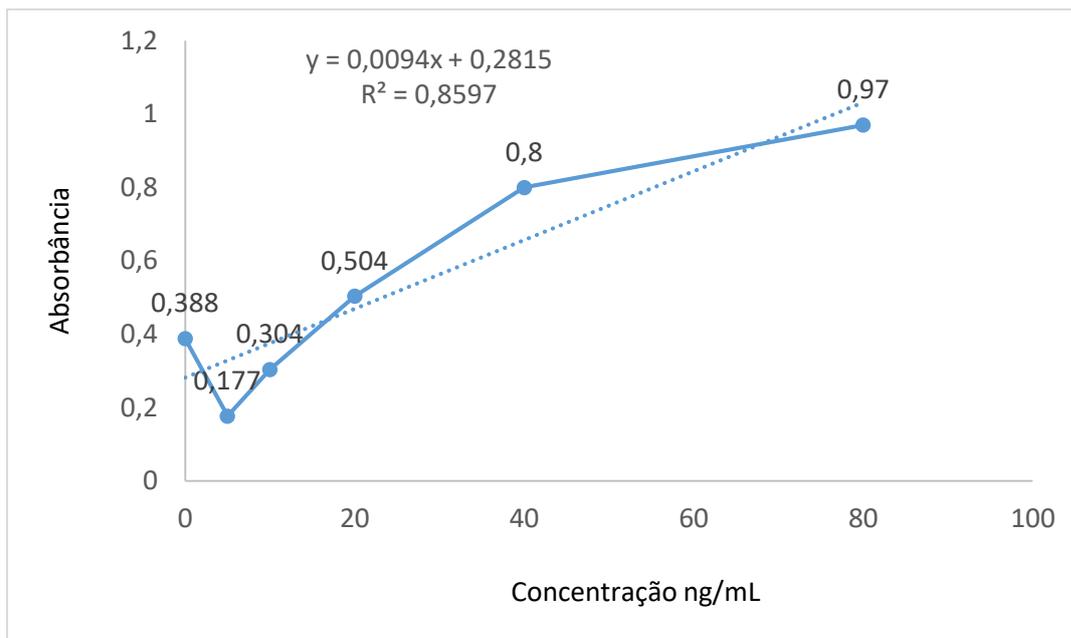


Gráfico 2 - Concentração x absorvância das Amostras da 2ª dia.

Existem vários estudos semelhantes que utilizam teste ELISA para verificar presença de glúten em alimentos, conforme citados abaixo que foram utilizados para comparar os resultados encontrados no presente estudo.

No estudo realizado por PIRES, 2013 onde foram avaliados biscoitos sem glúten, o autor observou que 6,7% dos rótulos apresentaram resultados diferentes do que estava informado nos rótulos. Nos biscoitos rotulados com a inscrição “não contém glúten”, todos apresentaram resultados positivo após análise da técnica ELISA. Neste estudo constatou-se que ocorreu contaminação por glúten nestes alimentos. Para comprovar a presença de glúten, principalmente em alimentos rotulados como isentos de glúten, o autor ressalta a importância de se utilizar mais de uma técnica de análise para confirmação dos resultados. Além de serem avaliados através da técnica ELISA R5, foi utilizado a técnica de PCR para confirmar a contaminação e identificar quais foram os cereais contaminantes, como por exemplo, se foi encontrado presença de cereais provenientes de trigo, centeio, cevada ou aveia (SANDBERG et al, 2003).

A contaminação cruzada com glúten representa um alto risco para a saúde e para a vida das pessoas com doença celíaca, sensibilidade ao glúten não-celíaca e alérgica ao glúten. Portanto, o cumprimento das regras, principalmente como a adoção de boas práticas de fabricação, controle rigoroso dos procedimentos operacionais padrão são extremamente necessários para

garantir a integridade e a segurança dos consumidores, segundo estudos realizados por Farage, et. al. (2017) e Farage et al., (2018). Outro problema citado por eles são os vários problemas que existem sobre a rotulagem dos produtos, o autor relata problemas desde a aquisição dos produtos até a rotulagem final, que não é rigorosamente seguida. No estudo realizado por VERMA et al, (2017) é mencionado que em serviços de fast food a chance de ocorrer contaminação por glúten é muito alta devido ao treinamento inadequado de pessoal, uso descuidado de ferramentas, bancadas, equipamentos, entre outros.

5.3. Análise por fitas Imunocromatográficas

Os resultados foram comparados visualmente e pode-se observar que 5 amostras apresentaram resultado positivo para a presença de glúten, as amostras positivas foram as de número 200 (amostra Controle), 62, 110, 12 e 61. As fitas possuem limite de detecção para alimentos sem glúten de 4,4 - 6,3 mg/kg de glúten. As amostras foram codificadas conforme já descrito anteriormente para a análise de ELISA R5.

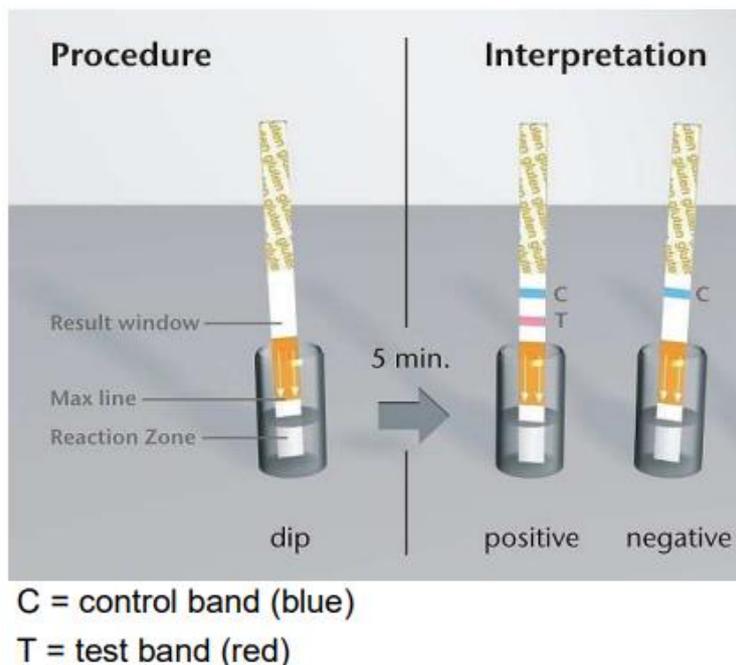


Figura 21 - Interpretação do resultado conforme fabricante das fitas imunocromatográficas.

Como já citado anteriormente na legislação brasileira existem normas que regulamentam para rotulagem quanto à presença ou ausência de glúten nos alimentos, porém não é estabelecido um controle laboratorial para essa

rotulagem. Também não há um método padrão para controle de qualidade dos produtos, nem um nível de concentração de glúten aceitável. O Codex Alimentarius considera aceitável um produto com até 20 ppm de glúten para alimentos naturalmente livres de glúten e 200 ppm para alimentos com glúten retirado para serem considerados “sem glúten” (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

Outro fator importante é a quantidade deste alimento que vai ser consumida por uma pessoa celíaca, por exemplo, como pela definição não existe uma definição de quantidade de glúten que o alimento contenha, consideramos que até 20 ppm de glúten é considerado como alimento livre de glúten, imagina que um celíaco poderia ingerir até 500 g desse alimento por dia sem danos à sua saúde, mas para outra pessoa celíaca apenas 1ppm pode ser totalmente intolerável, causando diversos problemas. E se pensarmos como aceitável um valor de até 5 ppm de glúten para o alimento ser considerado livre de glúten essa ingestão aceitável subiria para até 2 kg deste alimento por dia. O uso das fitas imunocromatográficas para a avaliação da presença ou ausência de glúten nos permitiria indicar para celíacos, com maior tranquilidade alimentos com resultado negativo quanto à presença de glúten (LAUREANO, 2010).

5.4 Comparação entre os métodos ELISA e fitas imunocromatográficas

Comparando os testes imunoenzimático (ELISA R5) com o imunocromatográfico (fitas), pode-se perceber que as fitas só indicam a presença ou ausência de glúten nas amostras analisadas, enquanto no teste ELISA R5 é possível determinar a concentração de glúten e gliadina presente nas amostras analisadas, conforme a tabela 10. Conforme observou-se durante a realização das análises as fitas foram desenvolvidas para serem um método mais prático e com um limite de detecção favorável.

No estudo realizado por LAUREANO (2010) foi relatado que o resultado do teste ELISA R5 acima de 5 ppm de glúten apresentou ótimos valores comprovando a adequação do uso das fitas imunocromatográficas a veracidade dos resultados, garantindo que as amostras tenham um valor de glúten inferior ou muito próximo a 5 ppm, uma vez que o resultado desse teste seja negativo ou inferior a 5 ppm. O autor compara o teste imunocromatográfico aos resultados de R5- ELISA maiores que 20 ppm de glúten, mostrando que amostras de glúten

que apresentam resultado negativo nas fitas realmente possuem valor de glúten inferior a 20 ppm.

Tabela 10 – Comparação dos resultados entre os métodos

Amostras	Resultados ELISA		Fitas imunocromatográficas
	Gliadina mg/Kg	Glúten mg/Kg	
200	>40,00	>80,00	Positivo
71	<2,50	<5,00	Negativo
100	<2,50	<5,00	Negativo
31	<2,50	<5,00	Negativo
51	<2,50	<5,00	Negativo
110	<2,50	<5,00	Positivo
120	<2,50	<5,00	Negativo
11	<2,50	<5,00	Negativo
41	<2,50	<5,00	Negativo
42	<2,50	<5,00	Negativo
91	<2,50	<5,00	Negativo
72	<2,50	<5,00	Negativo
61	<2,50	<5,00	Positivo
62	<2,50	<5,00	Positivo
12	<2,50	<5,00	Positivo
13	<2,50	<5,00	Negativo
81	<2,50	<5,00	Negativo

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O questionário online foi respondido por 115 pessoas, sendo que a maioria dos respondentes eram mulheres, com ensino superior. Todos os respondentes disseram saber o que é glúten, 92% seguem dieta sem glúten e 81% consomem produtos de panificação sem glúten. O produto sem glúten mais consumido por eles foi o pão.

Quando questionados sobre as características sensoriais o principal motivo da troca de alimentos com glúten por sem glúten foi a melhora de problemas de saúde para a maioria dos respondentes, seguido por perda ou ganho de peso. As principais diferenças encontradas nessa troca de produtos foi o preço, seguido da textura, do sabor e da cor dos produtos. Com bases nestes resultados podemos concluir que a maioria dos consumidores que responderam o questionário online sobre produtos sem glúten possuem DC, tem entendimento sobre o que é glúten e sobre a DC, assim como, ainda encontram dificuldades para realizar as refeições fora de casa.

Os resultados das fitas imunocromatográficas apresentaram divergência quando comparados com o teste de R5-ELISA, onde no teste de ELISA todas as amostras apresentaram resultados negativos para a presença de glúten, com exceção da amostra controle e no teste por fitas quatro amostras mais a controle apresentaram resultado positivo para a presença de glúten. Porém as fitas não demonstram um número exato da concentração, somente uma faixa de valor. Se considerarmos, para a rotulagem dos alimentos livres de glúten, um teor de glúten de até 5 ppm os dois testes se equivalem. O uso do teste das fitas imunocromatográficas demonstrou uma excelente opção para garantir aos celíacos a qualidade do seu alimento em relação ao teor de glúten, assim como é uma análise mais rápida e de fácil execução.

Podemos observar que a falta de informações corretas sobre o glúten, sua presença ou ausência em alimentos principalmente em serviços de alimentação, como restaurante, serviços de tele-entrega e lojas de produtos específicos para celíacos pode comprometer o tratamento para DC, embora esse tratamento possa ser considerado relativamente simples, uma vez que não requer o uso regular de medicamentos e/ou procedimentos de intervenção médica, somente seguir a dieta adequada. A necessidade de evitar alimentos que contenham

glúten geralmente traz mudanças consideráveis nos padrões de alimentação e estilo de vida dos celíacos, o que torna mais difícil de manter ao longo da vida.

Sendo assim, é importante refletirmos sobre o quanto a pessoa celíaca enfrenta dificuldades com sua alimentação e com problemas relacionadas à contaminação cruzada. A presença de traços de glúten nos alimentos sem glúten pode impedir a recuperação das pessoas com DC.

Outro fator preocupante é a atual legislação brasileira sobre a rotulagem e presença de glúten em alimentos, acredito que esta precisa ser revisada e melhorada, pois na atual legislação não existe a obrigatoriedade para os restaurantes e serviços de alimentação apresentarem identificação quanto a presença de glúten, comprometendo a adoção da alimentação adequada que os celíacos necessitam. Um dos problemas mais importantes no atual modelo de rotulagem é não possuir um padrão definido, nem limite específico de ppm para ser considerado livre de glúten, lembrando que o alimento pode ser considerado livre de glúten e ainda possuir traços em sua composição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACELBRA/SP. Associação de Celíacos do Brasil, São Paulo. Disponível em: <<http://www.acebra.org.br/2004/estatisticas.php> >. Acesso em: 20 de novembro de 2018.

AKOBENG, A. K.; THOMAS, A. G. Systematic review: Tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics** v.27, n.11, p. 1044–1052, 2008.

ARAÚJO, H. M. C.; ARAÚJO, W. M. C.; BOTELHO, R. B. A.; ZANDONADI, R. P. Doença Celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. **Revista de Nutrição**, v. 23, n.3, p. 467- 474, 2010.

ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC). **Certificate of performance tested status**. 2012. Disponível em: http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/RI/RI_MethodsCert/2013_08_1202_certificate.pdf. Acesso em: 20 novembro de 2018.

AUTODORE, J.; JATLA, M. Nutritional complications of celiac disease. **Practical Gastroenterology**, v. 23, n. 7, p. 34-39, 2009.

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

BENITES, A. J. **Implementação e validação do método de detecção de alergénios em alimentos por PCR em tempo real no Laboratório SGS**. 2016. 122 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Nova de Lisboa. 2016.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Lei nº 10.674 de 16 de maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 de maio 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-autorizacoes/alimentos/produtos/rotulagem>. Acesso em: 11 novembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **CONAB Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/busca?searchword=produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20trigo%202019&searchphrase=all>. Acesso em: 07 de setembro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Celíaca**. Portaria SAS/MS nº 307, de 17 de setembro de 2009. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/03/pcdt-doenca-celiaca-2009.pdf> Acesso em: 17 maio de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Celíaca**. Portaria SAS/MS nº 1149, de 11 de novembro de 2015. 11 de novembro de 2015. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/13/Portaria-SAS-MS---1149-de-11-de-novembro-de-2015.pdf> Acesso em: 20 novembro de 2018.

BRASIL. **Lei Orgânica de Segurança Alimentar Nutricional (LOSAN)**. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional-SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. Diário Oficial da União, 2006.

CASTRO, L. I. A.; VILA REAL, C. M.; PIRES, I. S. C.; PIRES, C. V.; PINTO, N. A. V. D.; MIRANDA, L. S.; ROSA, B. C.; DIAS, P. A. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild); digestibilidade *in vitro*, desenvolvimento e análise sensorial de preparações destinadas a pacientes celíacos. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 4, p. 413-419, 2007.

CATASSI, C.; FABIANI, E.; IACONO, G.; D'AGATE, C.; FRANCAVILLA, R.; BIAGI, F.; VOLTA, U.; ACCOMANDO, S.; PICARELLI, A.; DE VITIS, I. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 85, n. 1, p. 160–166, 2007.

CIACCI, C.; CICLITIRA, P.; HADJIVASSILIOU, M.; KAUKINEN, K.; LUDVIGSSON, J. F.; MCGOUGH, N.; SANDERS, D. S.; WOODWARD, J.; LEONARD, J. N.; SWIFT, G. L. The gluten-free diet and its current application in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. **United European Gastroenterology Journal**, v. 3, n. 2, p. 121-135, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Draft Revised Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten, Joint FAO/WHO Food Standards Program, 30th Session, ALINORM08/31/26 Appendix III, 2008.

DAHINDEN, I.; VON BÜREN, M.; LÜTHY, J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. **European Food Research and Technology**, v. 212, n. 2, p. 228-233, 2001.

DEBNATH, J.; MARTIN, A.; GOWDA, L. R. A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications for gluten-free labelling. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 782-787, 2009.

DINIZ-SANTOS, D.; MACHADO, A.P.L.; SILVA, L.R. Doença Celíaca. In: CARVALHO, ELISA DE; SILVA, LUCIANA R; FERREIRA, CRISTINA TARGA (Org.). **Gastroenterologia e Nutrição em Pediatria**. São Paulo: Manole, 2012. p. 359–403.

DESILVA, B., SMITH, W., WEINER, R., KELLEY, M., SMOLEC, JM., LEE, B., KHAN, M., TACEY, R., HILL, H.; CELNIKER, A. Recommendations for the

Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 11, p. 1885-1899, 2003.

FARAGE, P.; ZANDONADI, R. P.; GINANI, V.C.; GANDOLFI, L.; PRATESI, R.; NOBREGA, K. de M. Content validation and semantic evaluation of a check-list elaborated for the prevention of gluten cross-contamination in food services. **Nutrients**, v. 9, n. 1, p. 36, 2017.

FARAGE, P.; ZANDONADI, R. P.; GINANI, V.C.; GANDOLFI, L., E. Y. N.; PRATESI, R. Gluten-Free diet: From development to assessment of a check-list designed for the prevention of gluten Cross-Contamination in food services. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1-12, 2018.

FASANO, A., ARAYA, M., BHATNAGAR, S., CAMERON, D., CATASSI, C., DIRKS, M., MEARIN, M.L., ORTIGOSA, L., PHILLIPS, A., Federation of International Societies of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Consensus Report on Celiac Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 47, n. 2, p. 214-219, 2008.

FENACELBRA FEDERAÇÃO NACIONAL DAS ASSOCIAÇÕES DE CELÍACOS DO BRASIL (2015). Fenacelbra lança Campanha Reconhecer. Acesso em 06 de novembro de 2020, disponível em: <http://www.fenacelbra.com.br/fenacelbra/blog/2013/04/27/fenacelbra-lanca-campanhareconhecer/>

FREITAS, M.C.S, MINAVO, M.C.S, FONTES, G.A.V. Sobre o campo da Alimentação e Nutrição na perspectiva das teorias compreensivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 1-38, 2011.

GÉLINAS, P., MCKINNON, C. M., MENA, M. C., MÉNDEZ, E. Gluten contamination of cereal foods in Canada. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 7, p. 1245-1252, 2008.

HAN, Y., CHEN, W., LI, P., YE, J. Association between coeliac disease and risk of any malignancy and gastrointestinal malignancy – a meta-analysis. **Medicine**, v. 94, p. 1612 (1 – 7), 2015.

HUSBY, S., KOLETZKO, S. , KORPONAY-SZABÓ, I.R., MEARIN, M.L., PHILLIPS, A., SHAMIR, R., TRONCONE, R., GIERSIEPEN, K., BRANSKI, D., CATASSI, C., LELGEMAN, M., MÄKI, M., RIBES-KONINCKX, C., VENTURA, A., ZIMMER, K.P. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 136–160, 2012.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAGIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008/2009**: avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. Rio de Janeiro: 2010. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv47310.pdf> Acesso em: 17 maio de 2019.

LEE, A., NEWMAN, J. M. Celiac diet: its impact on quality of life. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 11, p. 1533-1535, 2003.

LAUREANO, Á. M. **Análise da presença de glúten em alimentos rotulados como livres de glúten através de ensaio imunoenzimático e de fitas imunocromatográficas.** 2010. 130 f. Dissertação (Ciências em Gastroenterologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010.

LUDVIGSSON, F. J., LEFFLER, A. D., BAI, J. C., BIAGI, F., FASANO, A. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. **Gut**. v. 62, p. 43-52, 2012.

LUND, F., HERMANSEN, M.N., PEDERSEN, T.H., TOFT-HANSEN, H., SÖLÉTORMOS, G. Mapping of HLA-DQ haplotypes in a group of Danish patients with celiac disease. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 75, p. 519-522, 2015.

MAHAN, L.K., ESCOTT-STUMP, S., RAYMOND, J.L. **Krause – Alimentos, Nutrição e Dietoterapia.** 13ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 618-619, 2012.

OLIVEIRA, O.M.V., ZANDONADI, R.P., GANDOLFI, L., de ALMEIDA, R. C., ALMEIDA, L.M., PRATESI, R. Evaluation of the presence of gluten in beans served at self-service restaurants: a problem for celiac disease carriers. **Journal of Culinary Science & Technology**. v. 12, p. 22-33, 2014.

PREICHARDT, L. D., VENDRUSCOLO, C. T., GULARTE, M. A., MOREIRA, A. S. Efeito da goma xantana nas características sensoriais de bolos sem glúten. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, n. 1, p. 70-76, 2009.

PIRES, Bruna Amatto Duarte. **Análise Qualitativa de Glúten em Alimentos: Métodos Imunoquímicos e Moleculares.** 2013, 83 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

PITÉ, Marina Rocha. **Validação de um método alternativo de análise de glúten em géneros alimentícios, o ELISA-R5: comparação com o actual método oficial de análise.** 2007, 100 f. Dissertação (Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

PRATESI, Claudia Beatriz. **Tradução, adaptação transcultural e validação de questionário para a avaliação de qualidade de vida de pacientes celíacos no Brasil.** 2019, 88 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

RESENDE, P.V.G, SILVA, N.L.M, SCHETTINO, G.C.M, LIU, P.M.F. Doenças relacionadas ao glúten. **Revista de Medicina de Minas Gerais**. v. 27, n. 3, p. 51-58, 2017.

ROSELL, C. M., MARCO, C. Rice. In: ARENDT, E. A.; DAL BELLO, F. (Ed.). *Gluten-free cereal products and beverages: food science and technology*. Oxford: Elsevier, 2008. 290 p.

SANDBERG, M.; LUNDBERG, L.; FERM, M.; YMAM, I.M. Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 344–349, 2003.

SAPONE, A.; BAI, J.C.; CIACCI, C.; DOLINSEK, J.; GREEN, P. H. R.; HADJIVASSILIOU, M.; KAUKINEN, K.; ROSTAMI, K.; SANDERS, D. S.; SCHUMANN, M. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. **BMC Medicine**. v. 10, n. 13, p. 1-12, 2012.

SILVA, Rafael Plaza. Detecção e quantificação de glúten em alimentos industrializados por técnica de ELISA. 2010. 73 F. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SMOLEC, J.M., DESILVA, B., SMITH, W., WEINER, R., KELLY, M., LEE, B., KHAN, M., TACEY, R., HILL, H. & CELNIKER, A. Bioanalytical Method Validation for Macromolecules in Support of Pharmacokinetic Studies. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 9, p. 1425-1431, 2005.

SOUZA, J.; SZCZEREPA, S. B.; SANTOS, L. Conhecimento de donos de estabelecimentos comerciais de alimentação sobre doença celíaca. **Revista Nutrir**, v. 1, n. 2, p. 2358-2669, 2015.

SOARES, C. G. Propriedades nutricionais, tecnológicas e sensoriais de farelo de arroz na elaboração de cookies. 2017. 55 f. **Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos)** – Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2017.

SOLLID, L. M.; KHOSLA, C. Future therapeutic options for celiac disease. *Nature Clinical Practice*. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 2, n. 3, p. 140-147, 2005.

TAYLOR, A.K.; LEBWOHL, B.; SNYDER, C.L.; GREEN, P.H.R. Celiac Disease. **Gene Reviews [Internet]**. Acesso em: 17 nov. 2018, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1727/>.

TERZI, V.; MORCIA, C.; GORRINIA, A.; STANCA, A.M.; SHEWRY, P.R.; FACCIOLI, P. Review - DNA-based methods for identification and quantification of small grain cereal mixtures and fingerprinting of varieties. **Journal of Cereal Science**, v. 41, p. 213-220, 2005.

THEETHIRA, T. G.; DENNIS, M. Celiac disease and the glutenfree diet: consequences and recommendations for improvement. **Digestive Diseases**, v. 33, n. 2, p. 175-182, 2015.

VALDÉS, I., GARCÍA, E., LLORENTE, M., MÉNDEZ, E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked

immunosorbent assay protocol. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 15, n. 7, p. 465-474, 2003.

VERMA, A. K.; GATTI, S.; T. GALEAZZI, C. MONACHESI, L. PADELLA, G. DEL BALDO, R. ANNIBALI, E. LIONETTI, C. CATASSI. Gluten contamination in naturally or labeled Gluten-Free products marketed in Italy. **Nutrients**. v. 9 n. 2, p. 1–10, 2017.

WILD, D., ROBINS, G. G., BURLEY, V. J.; HOWDLE, P. D. Evidence of high sugar intake, and low fibre and mineral intake, in the gluten-free diet. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 32, n. 4, p. 573-581, 2010.

YUAN, J., GAO J., LI, X., LIU, F., WIJMENGA, C., CHEN, H. The Tip of the “Celiac Iceberg” in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. The Tip of the “Celiac Iceberg” in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos One**. v. 6, p. 1 - 14, 2013.

Apêndices

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO SOBRE DOENÇA CELÍACA E ALIMENTAÇÃO

Questão 1: Faixa etária

- a) Menor de 18 anos
- b) Entre 18 e 29 anos
- c) Entre 30 e 40 anos
- d) Acima de 40 anos

Questão 2: Sexo

- a) Masculino
- b) Feminino

Questão 3: Grau de escolaridade

- a) Ensino fundamental
- b) Ensino médio
- c) Ensino superior
- d) Pós-graduação

Questão 4: Você sabe o que é GLÚTEN?

- a) Sim
- b) Não

Questão 5: Você costuma consumir produtos de panificação (pães, bolachas, bolos, pão de queijo) identificados como "SEM GLÚTEN"

- a) Sim
- b) Não
- c) As vezes

E qual a frequência do consumo desses produtos:

- a) Diariamente
- b) 2-3 vezes na semana
- c) Raramente

Questão 6: Você faz algum tipo de dieta com restrição de GLÚTEN?

- d) Sim
- e) Não

Questão 7: Você é celíaco ou possui alguma enfermidade relacionada ao GLÚTEN?

- a) Sim
- b) Não

Questão 8: Se você é celíaco, ou possui alguma restrição alimentar relacionada ao glúten responda as seguintes questões:

a) Você encontra produtos de panificação (pães, bolachas, bolos, pão de queijo) SEM GLÚTEN com facilidade:

- a) Sim
- b) Não

b) Você se sente seguro ao consumir alimentos rotulados como SEM GLÚTEN:

- a) Sim
- b) Não

c) Quais as maiores dificuldades em relação a essa restrição na sua alimentação:

- a) Preço dos produtos
- b) Dificuldade de encontrar produtos sem glúten
- c) Confiabilidade dos rótulos
- d) Realizar as refeições fora de casa

Questão 9: O que você sabe a respeito das enfermidades relacionadas ao GLÚTEN?

Questão 10: Se você é celíaco, mesmo com restrição alimentar ainda consome produtos de panificação (pães, bolachas, bolos e pão de queijo) que contenham GLÚTEN:

- a) Sim
- b) Não

Questões 11: Quais os produtos de panificação (ex: pães, bolachas, bolos e pão de queijo) que você consome SEM GLÚTEN.

Questão 12: Quais os produtos de panificação (ex: pães, bolachas, bolos e pão de queijo) que você mais consome COM GLÚTEN.

Questão 13: Qual motivo levou você a consumir produtos identificados como SEM GLÚTEN:

- a) Doença celíaca
- b) Outras doenças, intolerância ou alergia
- c) Perda de peso
- d) Dietas
- e) Acredita que o glúten traz algum risco a saúde
- f) Nenhuma das alternativas

Questão 14: Os produtos SEM GLÚTEN trazem benefícios para a saúde humana? Sim ou Não e por quê?

Questão 15: Você, ao trocar alimentos COM GLÚTEN por SEM GLÚTEN, notou alguma diferença/alteração na sua saúde quanto:

- a) Perda ou ganho de peso
- b) Melhora dos problemas digestivos
- c) Alergias
- d) Alterações de humor
- e) Nenhuma

Questão 16: Você, ao consumir produtos de panificação (pães, bolachas, bolos e pão de queijo) SEM GLÚTEN notou alguma diferença quando comparado aos produtos de panificação COM GLÚTEN quanto a:

- a) Textura
- b) Coloração
- c) Sabor
- d) Preço

APÊNDICE B – TABELA COM ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DO QUESTIONÁRIO (DADOS QUALITATIVOS)

Variável	Categorias	Contagens	Frequências	%
Você sabe o que é GLÚTEN?	1	114	114	100,000
Costuma consumir produtos S/G	1	92	92	80,702
	2	8	8	7,018
	3	14	14	12,281
Frequência do consumo	1	61	61	53,509
	2	25	25	21,930
	3	21	21	18,421
	4	7	7	6,140
Dieta S/G	1	104	104	91,228
	2	10	10	8,772
Enfermidade ao GLÚTEN	1	105	105	92,105
	2	9	9	7,895
a) Encontra produtos S/G com facilidade:	1	60	60	52,632
	2	54	54	47,368
b) Seguro ao consumo S/G	1	48	48	42,105
	2	66	66	57,895
c) Dificuldades	1	24	24	21,053
	2	11	11	9,649
	3	22	22	19,298
	4	57	57	50,000
Enfermidades ao GLÚTEN?	1	109	109	95,614
	2	5	5	4,386
Célico consome produtos com GLÚTEN:	1	6	6	5,263
	2	108	108	94,737
Consome produto SEM GLÚTEN.	1	30	30	26,316
	2	6	6	5,263
	3	3	3	2,632
	4	9	9	7,895
	5	3	3	2,632
	6	13	13	11,404
	7	7	7	6,140
	8	43	43	37,719
Produtos + consome C/G	1	5	5	4,386
	2	1	1	0,877
	3	3	3	2,632
	4	1	1	0,877
	7	95	95	83,333
	8	8	8	7,018
	1	1	1	0,877
	5	1	1	0,877
Motivo produtos S/GLÚTEN:	1	91	91	79,825
	2	15	15	13,158
	5	1	1	0,877
	6	7	7	6,140
Benefícios p/ saúde produtos S/G	1	89	89	78,070
	2	11	11	9,649

	3	14	14	12,281
Troca alimentos C/G por S/G	1	18	18	15,789
	2	75	75	65,789
	3	6	6	5,263
	4	3	3	2,632
	5	12	12	10,526
Diferença consumo S/G e C/G	1	46	46	40,351
	2	1	1	0,877
	3	21	21	18,421
	4	46	46	40,351