

Detecção de glúten em alimentos por meio de ELISA

Detection of gluten in foods by means of ELISA

RIALA6/1085

Rejane W. de ABREU^{1*}; Sônia F. C. BARBOSA²; Jussara C. de M. DELLA TORRE¹; Jaim LICHTIG¹; Odair ZENEON¹

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Doces e Amiláceos, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo/SP, Brasil e-mail: rwabreu@ial.sp.gov.br

²Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Imunologia, São Paulo/SP.

Recebido: 12/07/2006 – Aceito para publicação: 27/10/2006

RESUMO

A doença celíaca é caracterizada pela intolerância ou hipersensibilidade à ingestão de prolaminas existentes no trigo, centeio, cevada e aveia. As proteínas do glúten do trigo são constituídas de aproximadamente 50% de prolaminas, denominadas gliadinas. O tratamento adotado para a doença celíaca é a dieta livre de glúten. A legislação brasileira determina que os produtos alimentícios industrializados devem apresentar a advertência da presença ou ausência de glúten na rotulagem. Duas amostras de referência estabelecidas em um estudo interlaboratorial e treze produtos alimentícios industrializados foram analisados para determinar a presença de glúten por meio de ensaio imunoenzimático comercial, ELISA técnica sanduíche, utilizando-se anticorpo monoclonal anti ω gliadina. O limite de detecção foi de 10 ppm (mg/kg). As amostras de referência revelaram resultados satisfatórios com boa exatidão. O glúten foi detectado nos produtos alimentícios que continham o referido componente declarado na rotulagem. O glúten não foi detectado nas amostras declaradas isentas de glúten, com exceção de uma amostra. O ensaio imunoenzimático utilizado discriminou as prolaminas não tóxicas apropriadas para os pacientes com doença celíaca, como os da farinha de arroz, milho, soja, mandioca, batata e batata doce, cujos ingredientes constavam nos dizeres de rotulagem. Os resultados apresentados evidenciam a viabilidade de uso de ELISA para a detecção de baixos teores de glúten em alimentos.

Palavras-chave. gliadina, glúten, prolaminas, doença celíaca, ELISA.

ABSTRACT

Celiac disease is characterized by intolerance or hypersensitivity to ingested prolamins, which are composites of wheat, rye, barley and oats. Gluten proteins of wheat are constituted of approximately 50% of prolamins named gliadins. The treatment for celiac disease is a gluten - free diet. The Brazilian legislation determines that the industrialized food products must bring warning about the presence or absence of gluten in the respective labels. Two reference samples from interlaboratory study, and thirteen food products were analyzed for determining the gluten by means of commercially available immunoenzyme assay - ELISA sandwich format using monoclonal antibody anti- ω gliadin. The detection limit was of 10 ppm (mg/kg). Reference samples showed satisfactory results and good accuracy. Gluten was detected in analyzed food products in those the cited component was indicated in the respective labels. No gluten amount was detected in samples with indication of gluten absence, except in a sample. The used immunoenzyme assay discriminated non-toxic prolamins for patients with celiac disease, as in rice flour, corn, soy, manioc, potato, and sweet potato proteins, whose ingredients were indicated in the respective labels. The presented results evidence the performance and the practicability of ELISA for determining low levels of gluten in foods.

Key words. gliadin, gluten, prolamins, celiac disease, ELISA.

INTRODUÇÃO

O glúten é responsável por uma enteropatia denominada doença celíaca, caracterizada pela síndrome de má absorção de nutrientes e por lesões na membrana da mucosa do duodeno. A doença celíaca reflete uma permanente intolerância ao glúten, apresentando os seguintes sintomas: diarreia crônica, distensão, desnutrição, falta de apetite e vômitos^{1,2}.

A doença afeta ambos os sexos e pode ocorrer em qualquer idade; poderá surgir na infância, assim que são introduzidos na alimentação os primeiros grãos de cereais ou, posteriormente, desencadeada por fatores externos. Uma dieta livre de glúten é o único tratamento existente para os celíacos³.

O glúten é uma mistura de proteínas individuais classificadas em dois grupos, as prolaminas e as glutelinas. As prolaminas tóxicas para celíacos são as gliadinas do trigo, as secalinas do centeio, as hordeínas da cevada e as aveninas da aveia.

No trigo, o glúten contribui com aproximadamente 85% do teor das proteínas, restando 15% para as albuminas e globulinas. O teor de prolamina no glúten é geralmente considerado 50%⁴.

As gliadinas são proteínas monoméricas classificadas como α , β , γ e ω de acordo com a sua mobilidade eletroforética e seqüência de aminoácidos⁴. Experimentos *in vitro*, demonstraram que a seqüência do pentapetídeo glutamina-glutamina-prolina-fenilalanina-prolina (GGPPF) é responsável pela toxicidade na doença celíaca⁵. Existem, até o presente momento, divergências quanto à toxicidade das prolaminas da aveia para os celíacos^{6,7,8}.

Diante da gravidade da doença celíaca, no Brasil, a Lei Federal nº 8543/1992⁹ determinou a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten. Em 2002, pela Resolução RDC nº 40¹⁰ estendeu-se à obrigatoriedade da advertência “CONTÉM GLÚTEN” em caracteres com destaque, nítidos e de fácil leitura, também para as bebidas embaladas, excluindo as alcoólicas. Por último, a Lei nº 10.674/2003¹¹ obriga as inscrições “CONTÉM GLÚTEN” ou “NÃO CONTÉM GLÚTEN” nos rótulos de alimentos comercializados, como medida preventiva e de controle da doença.

A comissão do Codex Alimentarius da FAO (Food And Agricultural Organization of the United Nations) e da WHO (World Health Organization) tem estabelecido que os produtos contendo mais de 0,3% de proteínas do trigo, centeio, cevada e ou da aveia devem ser excluídos da dieta do celíaco. O amido do trigo com 0,3% de proteína apresenta aproximadamente 200 ppm (mg/kg) de glúten, sendo considerado “livre de glúten”. É recomendado que a detecção de glúten em alimentos e em seus ingredientes seja baseada em métodos imunológicos que ofereçam sensibilidade entre 20 e 100 ppm (mg/kg) de glúten. Entretanto, o limite de 20 ppm ainda está em discussão^{12,13}. Para garantir um alimento livre de glúten, o seu conteúdo deve ser controlado nos ingredientes e no produto final.

As gliadinas podem ser detectadas por análise de DNA¹⁴, espectrometria de massa¹⁵, western blotting e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)¹⁶. A técnica ELISA é a mais utilizada devida à especificidade e sensibilidade.

O teste de ELISA tipo sanduíche desenvolvido por Skerritt e Hill¹⁷ foi validado em estudo interlaboratorial¹⁸, adotado como método oficial da AOAC. O teste ELISA utiliza o mesmo anticorpo monoclonal tanto para captura como para anticorpo marcado. O determinante antigênico é estável ao calor e expresso, essencialmente, pela ω gliadina e por uma pequena quantidade de γ gliadina. O teste reconhece as prolaminas do centeio e da cevada detectando até 0,001% de glúten (10 ppm). O anticorpo não se liga às prolaminas da aveia, arroz, soja e milho. Este método encontra-se disponível no comércio na forma de kit.

Métodos analíticos sensíveis e específicos para detectar glúten que garantam a qualidade dos alimentos para consumo de celíacos necessitam ser implantados na rotina analítica dos Laboratórios de Saúde Pública que atuam juntamente com a Vigilância Sanitária. No presente trabalho, foi utilizado o Gluten Assay Kit, ensaio imunoenzimático, para a detecção de glúten nas amostras de referência e nos produtos industrializados disponíveis no comércio.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de referência A (2705) e B (2705) do controle interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK⁴: a amostra A era constituída de 2,2 kg de massa para bolo, livre de glúten, e amostra B da mistura de 20 g de massa de bolo comum com 2 kg de massa de bolo, livre de glúten. Na mistura para bolo livre de glúten, constavam os seguintes ingredientes: açúcar, farinha de arroz, amido de batata, agentes de crescimento (bicarbonato de sódio, fosfato dissódico), estabilizante (hidroxipropil metil celulose, carboximetilcelulose sódica, goma guar, goma xantana), sal, emulsificante ésteres de poliglicerol de ácidos graxos, estearoil-2-lactil-lactato de sódio) e amido de milho modificado⁶. Na mistura de bolo normal continham os ingredientes: farinha de trigo, açúcar, agentes de crescimento (hidrogenio carbonato de sódio, fosfato de alumínio e sódio), dextrose, leite em pó desnatado, maltodextrina, emulsificante (E471, E472b, E477), sal, estabilizantes (E466 e E450a), flavorizantes e corante (beta caroteno)⁴.

Produtos alimentícios industrializados

Treze amostras de diferentes produtos alimentícios adquiridas no comércio foram avaliadas levando em consideração a advertência da rotulagem, “contém ou não contém glúten”. Os produtos rotulados “não contém glúten” foram creme de arroz, amido de milho, biscoito salgado, biscoito tipo chips (raízes de mandioca, batata doce), lasanha, farinha de soja e macarrão. Os produtos declarados “contém glúten” compreendiam: biscoito artesanal tipo sequilho, farinha de aveia, biscoito maisena e biscoito integral (de aveia e mel), farinha de centeio e cevada torrada moída.

Reagentes

O gluten Assay Kit (Tepnel BioSystems,UK) é composto de: a) antígeno de gliadina liofilizada padrão; b) três amostras de controle com teores de glúten: baixo (<0,016%), médio (0,02-0,04%) e alto (0,1-0,3%); c) peroxidase ligada ao anticorpo monoclonal anti-omega gliadina diluído em tampão salino-fosfato com BSA (Soro albumina bovino) e timerosal; d) substrato TMB (tetrametilbenzidina), f) solução de lavagem concentrada (tampão Tris salino com timerosal); g) diluente das amostras concentrado (tampão salino-fosfato com gelatina e timerosal); h) solução finalizadora da reação 25% v/v de ácido fosfórico e i) placa de microtitulação com 12 tiras (96 alvéolos) e previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal de ômega gliadina.

Equipamentos

Homogeneizador de amostra (Diox 900 - Heidolph), centrífuga (Excelsa Baby II - Modelo 206-R – FANEM), lavadora de placas ELISA (Wellwash4 - Labsystems) e leitora de placas ELISA (Multiskan Ascent - Labsystems) com filtro.

Preparo das amostras

Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante contidas no kit. Resumidamente, as amostras foram extraídas com etanol a 40%, homogeneizadas (Diox 900) e centrifugadas (2500 rpm) por 10 min. Os extratos das amostras foram diluídos (v/v) em solução tampão. Os produtos declarados “não contém glúten” foram diluídos a 1/50 enquanto os rotulados “contém glúten”, assim como as amostras de referência e os controles fornecidos pelo kit com alta, média e baixa concentração de glúten, foram diluídos 1/50 a 1/20.000.

Procedimento

Alíquotas de 100µL das diluições do padrão de gliadina, dos extratos preparados e diluídos das amostras de controle de glúten, dos produtos alimentícios industrializados e das amostras de referência (A e B) foram adicionadas, em duplicata, nos alvéolos da placa de microtitulação. Após incubação por 60 minutos à temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes com solução tampão. Após adição de 100µL de conjugado, procedeu-se a incubação por 60 minutos, à temperatura ambiente e um novo ciclo de lavagem. Foram adicionados 100µL de substrato TMB a cada alvéolo e após 30 minutos, à temperatura ambiente, a reação foi paralisada com 50µL de solução finalizadora. A leitura da absorbância a 450nm foi realizada em leitora ELISA. As concentrações de glúten das amostras foram determinadas pela interpolação da média das absorbâncias frente a uma curva padrão pré-estabelecida com diluições do padrão de gliadina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva constituída com padrões de gliadina nas concentrações de 10, 20, 50, 100 e 200 ng/mL revelou (Figura

1) resposta linear ($r^2 = 0,980$) para a faixa de concentração utilizada, obedecendo a equação $Y = 0,0051 \log x + 0,1475$. O limite de detecção de 5 ppm de gliadina (10 ppm de glúten), estabelecido no kit, foi experimentalmente confirmado.

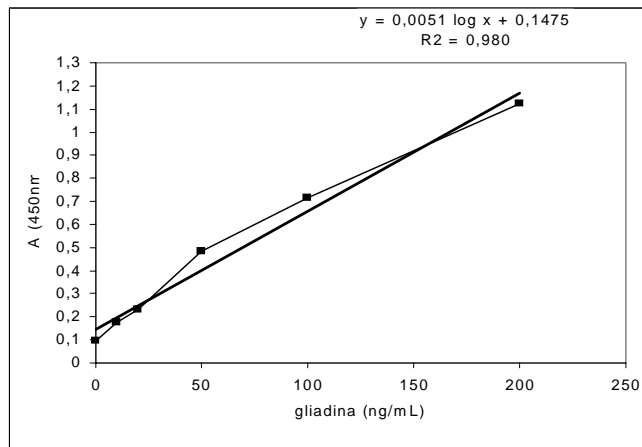


Figura 1. Curva padrão de gliadina.

Os teores dos padrões de glúten, fornecidos pelo kit, de alta, média e baixa concentração, foram, respectivamente, 1498, 216 e menor que 10 ppm (mg/kg). Na Tabela 1, estão apresentados os resultados do ensaio de exatidão realizado com as amostras de referência do estudo interlaboratorial de proficiência FAPAS/MAFF/UK. O valor-z (“z-score”) da determinação do glúten, estabelecido pela relação $z=(x-X)/\sigma$, onde x =concentração do analito determinada, X =concentração verdadeira do analito, σ =desvio-padrão para o valor x , foi considerado satisfatório para $|z| \leq 2$, questionável quando $2 < |z| \leq 3$ e insatisfatório se $|z| > 3$. Os valores encontrados neste trabalho para as amostras A e B foram considerados satisfatórios, por apresentarem valores de $|z| \leq 2$.

Tabela 1. Resultados do teor de glúten nas amostras de referência A e B valores-z obtidos no teste de proficiência FAPAS.

Amostras	Glúten (mg/Kg)		Valor -z
	Resultado do laboratório gluten Assay Kit	Resultado do FAPAS	
A	43	47,9	-0,6
B	440	665	-2,0

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da determinação do teor de glúten nos alimentos industrializados utilizando o Gluten Assay Kit. Não foi detectada a presença de glúten nos produtos designados sem glúten, exceto para o macarrão. Todas as amostras que apresentavam a advertência “contém glúten” foram positivas. Observa-se que na lista de ingredientes no rótulo do biscoito artesanal tipo sequilho não constava alguma fonte originária de glúten, contudo o resultado

analítico foi positivo, confirmando a sua presença na referida amostra. O ensaio revelou baixo teor para as prolaminas da cevada torrada e moída, fato este relatado por outros autores¹⁹. Quanto à análise da aveia, foi obtido o teor de glúten de 40 mg/kg, o que não era esperado, pois dados da literatura indicam que os anticorpos monoclonais para o gliadina não reconheceriam as prolaminas da aveia². Estudos de investigação com PCR, tornam-se necessários para confirmação da presença de glúten na aveia²⁰. O ensaio realizado discriminou as prolaminas não tóxicas para os celíacos como as dos alimentos constituídos de arroz, milho, soja, mandioca, batata e batata doce, cujos ingredientes constavam nos dizeres de rotulagem. O teor de glúten de 190 mg/kg obtido na análise do macarrão é considerado livre de glúten pela comissão do Codex Alimentarius da FAO/WHO (Food And Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization). Os resultados de glúten obtidos nos produtos alimentícios analisados evidenciam a viabilização para o uso do método de imunoensaio e a necessidade do controle dos alimentos, uma vez que os ingredientes podem, no processo de industrialização, sofrer contaminação, ou por outro lado, o glúten pode ser omitido da lista de ingredientes da rotulagem do alimento.

Tabela 2. Teor de glúten em produtos alimentícios comerciais.

Amostras	Marca	Ingredientes	Advertencia no rótulo	Glúten (mg/Kg)
Creme de arroz	A	Arroz		ND
Amido de milho	B	Amido de milho		ND
Biscoito salgado	C	Farinha de arroz, mandioca, manteiga, sal e gergelim.		ND
Biscoito tipo chips	D	Mandioca, batata doce, gordura vegetal e sal marinho.		ND
Lasanha	E	Amido de milho, amido de arroz, amido de batata, farinha de soja, farinha de arroz, emulsificante (E471). Farinha de soja	“NÃO CONTÉM GLÚTEN”	ND
Farinha de soja	F	Farinha de soja		ND
Macarrão	G	Farinha de arroz, farinha de milho, fécula de mandioca, carotenóides vegetais.		190
Biscoito artesanal tipo sequilho	H	Amido de milho, margarina, ovos, polpa de goiaba, edulcorante sucralose, conservante propionato de cálcio.		4.750
Farinha de centeio integral	I	Farinha de centeio		44.871
Cevada torrada e moída	J	Cevada		40
Farinha de aveia	K	Aveia	“CONTÉM GLÚTEN”	40
Biscoito maisena	L	Farinha de trigo, açúcar cristal, amido de milho, gordura vegetal hidrogenada, sal e leveduras, aroma artificial de baunilha.		14.900
Biscoito integral aveia e mel	M	Farinha de trigo integral e especial, óleo de milho, açúcar mascavo, flocos de aveia, mel, sal, aromas e estabilizante lecitina de soja.		26.760

ND= não detectado (menor que o limite de quantificação de glúten de 10mg/Kg ou 0,001g/100g).

CONCLUSÃO

O Gluten Assay Kit revelou simplicidade na operação, rapidez, adequação para o número de amostras ensaiadas e exatidão satisfatória na quantificação de glúten em amostras de controle interlaboratorial FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme / UK). Os resultados foram satisfatórios na detecção de glúten nas amostras comerciais avaliadas, não revelando reações cruzadas com os produtos de milho, arroz, soja, mandioca, batata e batata doce, cujos ingredientes constavam na lista de ingredientes da rotulagem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP pelo apoio financeiro do Projeto nº 01/03499-9.

REFERÊNCIAS

- Howdle PD, Blair GE. Molecular biology and coeliac disease. *Gut* 1992; 33: 573-75.
- Stern M, Ciclitia PJ, van Eckert R, Feighery C, Jansen FW, Mendez E, Mothes T, Troncone R, Wieser H. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 741-7.
- Troncone R, Auricchio S. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease). *Food Rev Int* 1991; 7: 205-31.
- Food Analysis Performance Assessment Scheme. Department for Environment, Food & Rural Affairs (DEFRA). Allergens Report 2705. Series 27. Round 05. February 2003. 29p. web: <http://www.fapas.com> e-mail: fapas@csl.gov.uk
- Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue). *Gastroenterol* 1992; 102: 330-54.
- Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJK, Kosma V-M, Maki M, Heikkinen M, Uusitupa MIJ. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 332-35.
- Lundin KEA, Nilssen EM, Scott HG, Loberg EM, Gjoen A, Bratlie J, Skar V, Mendez E, Lovik A, Kett K. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut* 2003; 52: 1649-52.
- Storsrud S, Olsson M, Arvidsson Lenner R, Nilsson L, Nilsson O, Kilander A. Adult coeliac patients do tolerate large amounts of oats. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 163-9.
- Brasil. Lei n. 8543 de 23 de dezembro de 1992. Determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten, a fim de evitar doença celíaca ou síndrome celíaca. *Diário Oficial da União, Brasília* (1992 dez 24); Sec.1. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/>.

10. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de alimentos e bebidas embalados que contenham glúten. Resolução RDC n. 40, 8 fevereiro 2002. Diário Oficial da União, Brasília (2002 fev 13). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/40_02rdc.htm.
11. Brasil. Lei n. 10.674 de 16 de maio de 2003. Obriga a que todos os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial da União, Brasília (2003 maio 19); Sec.1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
12. Hekkens W Th J M. Prolamin working group. Report about actions in relations to the FAO/WHO. In Working group prolamin analysis and toxicity, 8, Belgium 3 - 5 november 1993. Meeting. Tubigen, 1994 p 35-40.
13. Codex Alimentarius Commission, Proposed Draft Revised Standard for Gluten-free foods, Joint FAO/WHO Food Standards Program, 22nd Session, June 1997, ALINORM97/26 Appendix V.
14. Allmann M, Candrian U, Hofelein C, Luthy J. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food: Detection of wheat-contamination in non-wheat food products. *Z Lebensm Unters Forsch* 1993; 196: 248-51.
15. Mendez E, Valdes I, Camafeita E. Analysis of glúten in foods by MALDITOF mass spectrometry. In: Chapman JR (editor): *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NY: Human Press; 2000. pp. 355-67.
16. Scanlon MG, Sapirstein HD, Bushu KW. Evaluation of the precisin of HPLC for wheat- cultivar identification. *Cereal Sci* 1989; 66: 112-6.
17. Skerrit JH; Hill AS. Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassay for determination of gluten in foods. *J Agric Food Chem* 1990; 38: 1771-78.
18. Skerrit JH, Hill AS. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: Collaborative Study, *JAOAC*. 1991; 74: 257-64.
19. Valdez I, Garcia E, Llorent M, Mendez E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 465-74.
20. Mujico JR, Hernado A, Lombardia M, Benavides A, Silio V, Maki M, Kaukinen K, Collin P, Thorel L, Ryopy PH, Mendez E. Quantification of wheat, barley and rye contamination in oat samples by real-time PCR. In: *Stern Med Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity 30 September-3 October, 2004 Prague, Czech Republic 2005 Velag Wissenschaftliche Scripten* 87-93.