

# **Aplicação de um sistema de multi-sensores para a detecção de gliadinas: discriminação semi-quantitativa entre alimentos com glúten e sem glúten**

**Sofia Gabriel Meirinho**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para  
obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

**Doutor António Manuel Coelho Lino Peres**

**Doutora Ana Cristina Araújo Veloso**

**Bragança**

**2009**

Trabalho realizado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, no âmbito dos projectos de investigação POCI/QUI/58706/2004 e PPCDT/QUI/58076/2004, financiados pela FCT.

Sob a orientação de:

Doutor António Manuel Coelho Lino Peres

Doutora Ana Cristina Araújo Veloso

---

## RESUMO

A doença celíaca caracteriza-se pela intolerância ou hipersensibilidade à ingestão de prolaminas existentes no trigo, centeio, cevada e aveia. As proteínas do glúten do trigo contêm aproximadamente 50% de prolaminas, denominadas por gliadinas. O tratamento para a doença celíaca consiste em fazer uma dieta livre de glúten. Assim sendo, torna-se imperativo dispor de metodologias analíticas capazes de detectar e quantificar o teor de glúten em alimentos, especialmente em alimentos rotulados “sem glúten”.

Neste trabalho, estudou-se a aplicabilidade de um sistema de multi-sensores (e-tongue), com 36 membranas poliméricas de sensibilidade cruzada como técnica analítica alternativa para análise qualitativa e semi-quantitativa de produtos alimentares. O objectivo foi estabelecer uma distinção, entre alimentos “com” e “sem glúten”. A discriminação entre os alimentos analisados baseou-se na capacidade do sistema multi-sensor fornecer diferentes perfis potenciométricos consoante diferentes conteúdos de gliadinas presentes nos alimentos, após extracção com uma solução aquosa de etanol a 70%. Os perfis de sinais do sistema de multi-sensores em conjunto com métodos estatísticos multivariados de reconhecimento de padrões, nomeadamente a análise discriminante, foram utilizados para diferenciar alimentos “com” e “sem glúten”. Foram analisados quinze alimentos comercializados em Portugal e, adquiridos em supermercados: 8 alimentos cujo rótulo indicava a presença de glúten e 7 alimentos, com indicação no rótulo de ausência de glúten. O teor de gliadinas nos alimentos estudados foi confirmado por cromatografia líquida de alta resolução, após a sua extracção. O sistema de multi-sensores utilizado, apresentou um desempenho satisfatório na diferenciação de extractos com diferentes teores de gliadinas, permitindo discriminar alimentos “com” e “sem glúten” com sensibilidade e especificidades globais superiores a 95% nos dados originais e de 75% no processo de validação cruzada. Além disso permitiu classificar de forma semi-quantitativa um alimento em 3 grupos: alimento sem glúten (<10 ppm), alimento com teor de glúten (20-40 ppm) e alimento com teor de glúten (100-400 ppm). Nesta discriminação obteve-se sensibilidades e especificidades globais de 100% e superiores a 79% para os dados originais e procedimento de validação cruzada (predição), respectivamente.

---

Os resultados satisfatórios obtidos mostraram que o sistema potenciomérico de multi-sensores desenvolvido com base em membranas lipo-poliméricas pode ser utilizado como uma ferramenta na detecção preliminar de glúten em alimentos.

---

## 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 gluten - free diet.

A multisensor potentiometric (e-tongue) with 36 cross-sensibility polymeric membranes was applied for qualitative foodstuffs analysis. The objective was to distinguish gluten-containing from gluten-free foods. The discrimination was based on the capability of the e-tongue device to detect different gliadins contents. The e-tongue signal profiles were used together with supervised multivariate statistical methods for pattern recognition. A set of 15 Portuguese foods (7 foods samples with gluten-free indicating and 8, indicating gluten-containing), purchased in commercial supermarkets were analyzed. The multisensor systems used, showed satisfactory performance in the differentiation of extracts with different levels of gliadins, allowing discriminating food "with gluten" and "gluten free" with an overall sensitivity and specificity higher than 95% in the original data and 75% for the cross-validation procedure. Moreover it allowed to semi-quantitatively classify food samples into 3 groups: gluten-free food (<10 ppm), gluten-containing foods (20-40 ppm) and gluten-containing food (100-400 ppm). This discrimination was achieved with an overall sensitivity and specificity of 100% and greater than 79% for the original data and cross-validation (prediction) procedure, respectively. The satisfactory results obtained showed that the multisensor potentiometric device developed based on lipo-polymeric membranes can be used as an effective tool in the preliminary detection of gluten in foods.

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Doutor António Peres, meu orientador, por todo o empenhamento, atenção dispensada, disponibilidade, apoio e compreensão a todos os níveis, e também pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Doutor Luís Dias por todo o empenhamento, atenção dispensada, disponibilidade, apoio e compreensão a todos os níveis, e também pelos conhecimentos transmitidos.

À Doutora Ana Cristina Veloso, minha orientadora, por todo o empenhamento, atenção dispensada, disponibilidade, apoio e compreensão a todos os níveis, e também pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Eng. Jorge Sá Morais por estar sempre disponível para ajudar quando surgiam os problemas cromatográficos e por todos os conhecimentos transmitidos.

A todos os meus amigos, especialmente, Daniela, Ana Paula, Anabela, Soraia, Ivo e Hugo por toda a amizade e incentivo, por estarem sempre presentes e disponíveis para ouvirem as minhas reinvocações, nos bons e maus momentos.

A todo o pessoal do laboratório pelo apoio e carinho, em especial à Soraia e a Lilian, pela ajuda no HPLC e paciência.

À minha família, em especial a minha mãe, pelo incondicional apoio, compreensão e paciência que sempre me dedicaram.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram a tornar este momento possível.

A todos o meu “Muito Obrigado”

---

# ÍNDICE GERAL

	Pág.
<b>RESUMO</b> .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	VI
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	VII
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
ABREVIATURAS .....	XII
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
INTRODUÇÃO .....	1
1.1. IMPORTÂNCIA DO GLÚTEN .....	2
1.2. PROTEÍNAS DO GLÚTEN .....	3
1.3. DOENÇA CELÍACA .....	6
1.4. LEGISLAÇÃO E LIMITES DE TOLERÂNCIA AO GLÚTEN .....	8
1.5. MÉTODOS DE DETECÇÃO E ANÁLISE DO GLÚTEN .....	9
1.6. SISTEMA DE MULTI-SENSORES .....	13
1.7. OBJECTIVOS .....	14
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	16
MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
2.1. AMOSTRAGEM .....	17
2.2. MÉTODO DE ANÁLISE DE GLIADINAS EM ALIMENTOS POR HPLC .....	17
2.2.1. Equipamento .....	17
2.2.2. Reagentes e Padrões .....	18
2.2.3. Quantificação das soluções padrão de gliadina .....	18
2.2.4. Preparação de soluções e extractos .....	18
2.2.5. Condições cromatográficas para análise de gliadinas .....	20
2.2.6. Identificação dos picos referentes às gliadinas nos cromatogramas das amostras de alimentos .....	20
2.2.7. Parâmetros analíticos avaliados no método de HPLC .....	20
2.3. ANÁLISE DE GLIADINAS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS POR SISTEMA MULTI-SENSORES .....	22
2.3.1. Equipamento .....	22
2.3.2. Reagentes e Solventes .....	22
2.3.3. Preparação de soluções e extractos .....	23
2.3.4. Análise com o sistema de multi-sensores .....	25
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
3.1. ANÁLISE DE GLIADINAS POR HPLC .....	30
3.1.1. Quantificação das soluções padrão por Kit “Coomassie Plus assay reagent” .....	30
3.1.2. Linearidade e curva de calibração do sistema de HPLC .....	32
3.1.2.1. Limites detecção e quantificação .....	33
3.1.2.2. Precisão .....	35

---

3.1.3. Identificação dos picos de gliadinas nas amostras de alimentos estudadas.....	35
3.1.4. Quantificação de gliadinas nos alimentos por HPLC.....	40
3.2. ANÁLISE DOS ALIMENTOS COM O SISTEMA MULTI-SENSOR .....	41
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	49
CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS.....	60
ANEXO A: PROCEDIMENTO DE QUANTIFICAÇÃO DOS PADRÕES DE GLIADINA.....	61

---

# ÍNDICE DE TABELAS

Pág.

Tabela 1: Diferentes tipos de proteínas do glúten (adaptado de H.Wieser [5]).....	4
Tabela 2. Aditivos e plastificantes usados na preparação das membranas poliméricas.	23
Tabela 3. Concentrações de gliadinas determinadas por HPLC nos extractos e a respectiva concentração de gliadinas por kg de alimento, nos diferentes alimentos analisados “com” e “sem glúten”. .....	41
Tabela 4. Matriz de contingência da análise discriminante de 3 grupos de concentrações de gliadinas extraídas dos 15 alimentos analisados pelo sistema de multi-sensores. ....	44
Tabela 5. Matriz de contingência da análise discriminante, para a validação cruzada, de 3 grupos com diferentes concentrações de gliadinas extraídas da Papa 4 (com e sem adição de padrão de gliadinas). .....	47

---

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Modelo estrutural sugerido para o glúten de trigo (retirado de P.R. Shewry [10]).	6
Figura 2. Esquema da instalação experimental na análise recorrendo ao sistema de multi-sensores.	25
Figura 3. Sistema de multi-sensores e o eléctrodo de referência Ag/AgCl.	26
Figura 4. Recta de calibração do padrão albumina (BSA kit Pierce).	31
Figura 5. Perfis cromatográficos obtidos por HPLC (210 nm) das 6 soluções de padrão gliadinas utilizadas na elaboração da recta de calibração.	32
Figura 6. Recta de calibração das soluções padrão de gliadina medidas por HPLC.	33
Figura 7. Cromatograma típico das gliadinas.	36
Figura 8. Espectro UV das gliadinas obtido por HPLC.	36
Figura 9. Perfis cromatográficos das amostras alimentares “com glúten” obtidos por HPLC a 210 nm.	38
Figura 10. Perfis cromatográficos das amostras alimentares “sem glúten” obtidos por HPLC a 210 nm.	39
Figura 11. Representação gráfica das 2 primeiras funções discriminantes dos extractos etanólicos.	44
Figura 12. Representação gráfica das 2 primeiras funções discriminantes das misturas etanólicas.	47

---

## ABREVIATURAS

**ADN** – ácido desoxirribonucleico

**AOAC** – Associação de Químicos Analíticos Oficiais (abreviatura de “Association of Official Analytical Chemistry”)

**CE** – eletroforese capilar

**CV%** - coeficiente de correlação

**Da** – Dalton

**DC** – Doença celíaca

**ELISA** – *Ensaio por imunoabsorção ligado a enzimas* (abreviatura de “Enzyme linked immuno sorbent assay”)

**FAO** - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (abreviatura de “Food and Agriculture Organization”)

**GC** – cromatografia gasosa (abreviatura de “Gas Chromatography”)

**HMW** - subunidades de gluteninas de alto peso molecular

**HPLC** – cromatografia líquida de alta resolução (abreviatura de “High Performance Liquid Chromatography or High pressure liquid chromatography”)

**kDa** – kilodalton

**LD** – limite de detecção

**LQ** – limite de quantificação

**LMW** – subunidades de gluteninas de baixo peso molecular

**MALD-TOF** – desorção/ ionização laser assistida por matriz acoplada detector de iões (abreviatura de “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight”)

**MS** – espectrometria de massa (abreviatura de “Mass Spectrometry”)

**MWs** – massas moleculares

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PAGE** – eletroforese em gel poliacriláida (abreviatura de “polyacrylamide gel electrophoresis”)

**PCR** - reacção em cadeia da polimerase (abreviatura de “Polymerase chain reaction”)

**RT-PCR** – reacção em cadeia da polimerase em tempo real (abreviatura de “Real-time polymerase chain reaction”)

**SDS-PAGE** – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (abreviatura de “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”).

---

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO**

1.1. IMPORTÂNCIA DO GLÚTEN

1.2. PROTEÍNAS DO GLÚTEN

1.3. DOENÇA CELÍACA

1.4. LEGISLAÇÃO E LIMITES DE  
TOLERÂNCIA AO GLÚTEN

1.5. MÉTODOS DE DETECÇÃO E  
ANÁLISE DO GLÚTEN

1.6. SISTEMA DE MULTI-SENSORES

1.7. OBJECTIVOS

O trigo é uma das mais importantes culturas de cereais a nível mundial, em termos de produção e utilização na alimentação humana. É uma importante fonte de energia, proteína e fibra. O trigo é consumido em muitas formas diferentes, principalmente no pão, massas, bolachas, bolos, pizzas, entre outros. A capacidade da farinha de trigo ser transformado em diferentes alimentos é amplamente determinada pelas proteínas do glúten. Os grãos de trigo contêm 8% a 20% de proteínas. As proteínas do glúten constituem 80% a 85% do total das proteínas da farinha, e conferem propriedades de elasticidade e extensibilidade que são essenciais para a funcionalidade da farinha de trigo [1].

### 1.1. IMPORTÂNCIA DO GLÚTEN

A importância do glúten na indústria alimentar deve-se essencialmente às propriedades das suas proteínas. Estas desempenham um papel fundamental na determinação da qualidade do trigo, especialmente no cozimento ao conferir capacidade de absorção da água, retenção de gás, coesividade, viscosidade e elasticidade à massa [2-5]. As proteínas presentes no glúten podem ser divididas em duas fracções principais de acordo com a sua solubilidade numa solução de etanol e água: gliadinas caso sejam solúveis e gluteninas caso sejam insolúveis. Ambas as fracções apresentam elevados conteúdos em glutamina e prolina [5].

Por exemplo, as propriedades reológicas das massas são condicionadas pelo teor em gliadinas e gluteninas. As gliadinas quando hidratadas têm pouca elasticidade e são menos coesas que as gluteninas; contribuem principalmente para a viscosidade e extensibilidade da massa. Em contraste, as gluteninas quando hidratadas são coesas e elásticas e são responsáveis pela força e elasticidade da massa [4-7].

A ausência de glúten resulta frequentemente numa massa líquida em lugar de uma massa pré-cozedura e pode resultar num pão cozido com uma textura esmigalhada, cor pobre e outros defeitos na qualidade da pós-cozedura. A remoção do glúten das farinhas pode conduzir a graves problemas para a indústria da panificação e, actualmente, muitos produtos sem glúten disponíveis no mercado são de baixa qualidade, exibindo características sensoriais em geral pouco apetecíveis para os consumidores [4].

As proteínas do glúten estão entre as proteínas mais complexas da natureza devido ao seu grande número de componentes e tamanhos diferentes, devido à variabilidade

causada pelo genótipo, condições culturais e processos tecnológicos. Elas influenciam as propriedades reológicas da massa e apresentam uma influência muito significativa na qualidade de panificação do trigo [5].

## 1.2. PROTEÍNAS DO GLÚTEN

Glúten de trigo é um termo geral para as proteínas da farinha de trigo pouco solúveis em água [8]. De um ponto de vista bioquímico, o glúten é uma mistura de quatro tipos de proteínas: albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas. As albuminas e globulinas são aproximadamente 15% das proteínas. Os restantes 85% correspondem às proteínas monomérica e polimérica, denominadas gliadina e glutenina, dos quais 40% são gliadinas. As gliadinas e gluteninas encontram-se em quantidades aproximadamente idênticas no glúten de trigo, e podem ser diferenciadas tendo-se em conta a solubilidade de cada fracção em etanol: as gliadinas são solúveis numa solução aquosa de etanol (por exemplo 60%) enquanto as gluteninas são insolúveis nesta mesma solução. Estas duas fracções são caracterizadas por elevadas quantidades de glutamina e prolina e por baixas quantidades de aminoácidos com grupos laterais carregados [5].

As gluteninas (solúveis em ácido) são polímeros podendo ser divididas em subunidades de gluteninas de alto (HMW) e baixo (LMW) peso molecular. As gliadinas (solúveis em álcool) são proteínas monoméricas apresentando as fracções  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\omega$ -, cuja classificação depende da mobilidade [9].

A cisteína é um aminoácido das proteínas do glúten cuja quantidade apesar de reduzida (aproximadamente 2%), é extremamente importante para a estrutura e funcionalidade deste, pois é a responsável pelas ligações dissulfeto entre uma mesma cadeia de proteína (ligação intramolecular) ou entre as proteínas (ligação intermolecular) [5].

A maioria das gliadinas, estão presentes como monómeros e apresentam massas molares (MWs) compreendidas entre 28.000 a 50.000 g mol<sup>-1</sup>. Podem ser agrupadas em quatro diferentes tipos com base na sua mobilidade a pH baixo ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ -gliadinas, em ordem decrescente de mobilidade) [5]. Estudos posteriores em aminoácidos, no entanto, têm demonstrado que a mobilidade electroforética nem sempre reflecte as relações das proteínas e que a  $\alpha$ -gliadina e  $\beta$ -gliadina ficam num grupo ( $\alpha/\beta$ -tipo). Os

métodos analíticos, como a electroforese bidimensional ou cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa permitem a separação da fracção de gliadina em mais de cem componentes. Com base na análise completa ou parcial das sequências dos aminoácidos, composição em aminoácidos e MWs, estas fracções podem ser agrupadas em quatro tipos diferentes:  $\omega$ 5-,  $\omega$ 1,2-,  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas, como indicado na Tabela 1 [5].

Tabela 1: Diferentes tipos de proteínas do glúten (adaptado de H. Wieser [5])

Tipo	MW x 10 <sup>-3</sup> (g/ mol)	Proporções <sup>a</sup> (%)	Composição parcial de aminoácidos (%)				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
$\omega$ 5-Gliadinas	49-55	3-6	56	20	9	1	1
$\omega$ 1,2-Gliadinas	39-44	4-7	44	26	8	1	1
$\alpha/\beta$ -Gliadinas	28-35	28-33	37	16	4	3	2
$\gamma$ -Gliadinas	31-35	23-31	35	17	5	1	3
$\alpha$ -HMW-GS	83-88	4-9	37	13	0	6	19
$\beta$ -HMW-GS	67-74	3-4	36	11	0	5	18
LMW-GS	32-39	19-25	38	13	4	1	3

<sup>a</sup>De acordo com as proteínas totais de glúten.

As  $\omega$ -gliadinas apresentam maior quantidade de glutamina, prolina e fenilalanina, representando 80% da composição total. A maioria das  $\omega$ -gliadinas não contém cisteína, portanto não existe a possibilidade de ligações dissulfeto. As  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas, principais constituintes da gliadina, tem proporções de glutamina e prolina muito menores que as  $\omega$ -gliadinas, e diferem significativamente na quantidade de alguns poucos aminoácidos como a tirosina. Estes dois tipos de gliadinas apresentam os domínios N- e C-terminal diferentes. O domínio N-terminal consiste principalmente de sequências repetitivas ricas em glutamina, prolina, fenilalanina e tirosina e é único para cada tipo de gliadina. Quanto ao domínio C-terminal, as  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas são homólogas, apresentando sequências não repetitivas que contêm menos glutamina e prolina que o domínio N-terminal. Com algumas excepções, as  $\alpha/\beta$ -gliadinas contêm seis e as  $\gamma$ -gliadinas oito cisteínas localizadas no domínio C-terminal e formam três e quatro ligações cruzadas intramoleculares, respectivamente [5].

A fracção das gluteninas compreende proteínas agregadas ligadas por ligações dissulfeto intermoleculares; têm tamanhos variáveis, desde 500.000 g mol<sup>-1</sup> até valores superiores a 10 milhões. Após a redução das ligações dissulfeto, as subunidades de

glutenina resultantes apresentam uma solubilidade em solução alcoólica semelhante às gliadinas, e são divididas em subunidades de gluteninas de baixo peso molar (LMW) e de alto peso molar (HMW). O tipo predominante de proteína são as subunidades de glutenina LMW, que estão relacionadas com as  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas em massa molar e composição de aminoácidos. As gluteninas LMW contêm dois domínios diferentes: o domínio N-terminal, que consiste de unidades repetitivas ricas em glutamina e prolina, e o domínio C-terminal, que é homólogo ao das  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas. As gliadinas LMW contêm oito cisteínas; seis resíduos estão em posições homólogas às  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas, e portanto, propõe-se que estão ligadas por ligações dissulfeto intramoleculares [5].

As subunidades de glutenina HMW têm as maiores massas molares de todas as proteínas do glúten, com sequências ricas nos aminoácidos prolina, glutamina e glicina [10]. A glutenina HMW consiste de três domínios estruturais: um domínio não-repetitivo N-terminal (A), um domínio central repetitivo (B) e um domínio C-terminal (C). Os domínios A e C são caracterizados pela presença da maioria ou de todas as cisteínas [11]. Observa-se, portanto, que as ligações dissulfeto têm um papel importante na determinação da estrutura e propriedades das proteínas de glúten, visto que as  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas apresentam três e quatro ligações dissulfeto intramoleculares, respectivamente, enquanto as gluteninas LMW e HMW incluem tanto ligações dissulfeto intramoleculares quanto ligações intermoleculares [12].

Na Figura 1 apresenta-se esquematicamente a estrutura do glúten, onde as subunidades de glutenina HMW se ligam através de ligações dissulfeto intermoleculares formando um esqueleto, que forma a base para as ramificações da subunidade de glutenina LMW (também ligadas por ligações dissulfeto). As gliadinas também podem interagir com os polímeros de glutenina por interações não-covalentes [10].

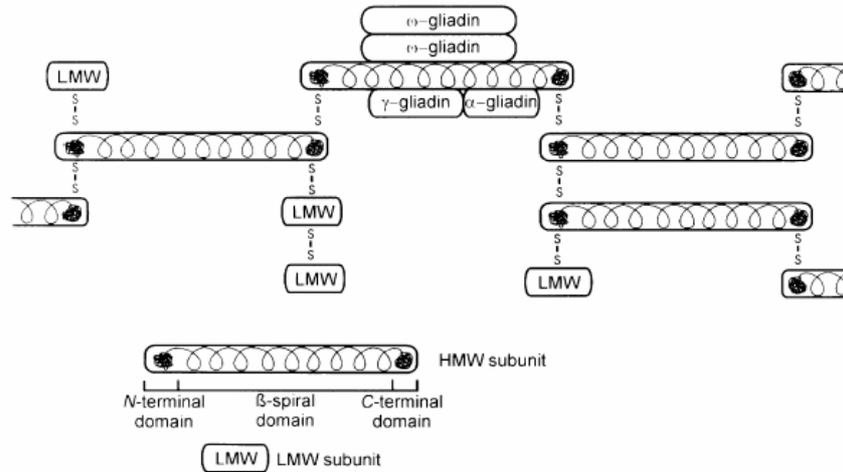


Figura 1: Modelo estrutural sugerido para o glúten de trigo (retirado de P.R. Shewry [10]).

As proteínas da farinha de trigo são elicitores das alergias alimentares se estiverem presentes na dieta de indivíduos com alergia, mesmo em baixas concentrações. Após sua ingestão podem causar reacções de hipersensibilidade aguda nos indivíduos com predisposição genética [13].

### 1.3. DOENÇA CELÍACA

A doença celíaca, também conhecida como enteropatia sensível ao glúten, é uma doença intestinal inflamatória crónica, auto-imune permanente, que se manifesta em indivíduos com predisposição genética através da ingestão de prolaminas [14]. É causada por uma intolerância permanente ao glúten, composto proteico presente em cereais como o trigo, o centeio, a cevada e a aveia [15]. A fracção tóxica do glúten é a gliadina, sendo esta a responsável pelas manifestações clínicas da doença. As gliadinas dividem-se nas fracções  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\omega$ -, sendo todas tóxicas para pacientes com doença celíaca, embora a fracção mais tóxica pareça ser a  $\alpha$ -gliadina [16].

A toxicidade está relacionada com a inactivação inadequada das células-T intestinais, que reconhecem os péptidos de gliadinas modificados pela enzima transglutaminase tesidular (tTG ou TG2) nos indivíduos que apresentam moléculas celulares HLA-DQ2/DQ8 activadas pelos péptidos da gliadina do trigo e prolaminas relacionadas da cevada e centeio [17].

Após a ingestão de glúten, os indivíduos que padecem de doença celíaca sofrem de uma inflamação crónica da mucosa duodenal que conduz a uma fraca absorção dos nutrientes essenciais, incluindo ferro, ácido fólico, cálcio e vitaminas lipossolúveis [17-31]. De facto, as gliadinas impulsionam o sistema imunitário para a produção de auto-anticorpos. Para além de anticorpos anti-gliadina, são também gerados no organismo anticorpos contra a transglutaminase tecidular. Estes dois auto-anticorpos são responsáveis pelos danos causados no intestino delgado [18]. Além disso, os pacientes com doença celíaca tendem a sofrer de outras doenças crónicas nas quais o sistema imunitário ataca as suas próprias células e tecidos, incluindo diabetes de tipo 1, doença auto-imune da tiróide, doença auto-imune do fígado, artrite reumatóide, doença de Addison e síndrome de Sjögren, bem como cancro intestinal, osteoporose, infertilidade feminina, perturbações neurológicas e psiquiátricas, entre outras [20,22,30-32]. Segundo estudos de base populacional, chegou-se à conclusão que a prevalência da doença celíaca se encontra numa escala de 0,5 a 1,0 % na Europa e nos Estados Unidos [20,22,31,33-35].

O glúten é uma fracção proteica do cereal predominante que se pode encontrar, por exemplo, no trigo, espelta, cevada, centeio e os seus híbridos [18-20,36]. As proteínas: gliadina (trigo), secalina (centeio), hordeína (cevada) e possivelmente as aveninas (aveias) são descritas como activadoras [4,36-38]. Muitos autores consideram que a aveia não é tóxica para o doente celíaco e que ele poderá tolerar pequenas porções deste cereal, porque o conteúdo em prolamina é cinco vezes menor do que no trigo, centeio ou cevada. Contudo, esta matéria é ainda um pouco discutível, não sendo consensualmente aceite por parte dos investigadores responsáveis pelos diferentes ensaios clínicos em doentes celíacos [39,40].

Os distúrbios revertem, parcial ou totalmente, quando estabelecida uma dieta permanente e rigorosa isenta de glúten, sendo este o único tratamento disponível até ao momento, permitindo quer a recuperação da mucosa intestinal quer a prevenção de outras condições complicadas [4,18,19,21,34,41]. Os pacientes têm de efectuar uma dieta à base de alimentos naturalmente isentos de glúten, como o amido, arroz, painço e trigo mourisco ou em produtos cuja base seja o trigo ou o amido de cevada que são modificados de forma a serem isentos de glúten [28,30].

#### 1.4. LEGISLAÇÃO E LIMITES DE TOLERÂNCIA AO GLÚTEN

A legislação europeia exige uma rotulagem obrigatória da indicação das substâncias potencialmente alergêneas no rótulo dos géneros alimentícios através da Directiva 2003/89/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de Novembro, transposta para a ordem jurídica interna pelo Decreto-Lei n.º 126/2005 de 5 de Agosto e este por sua vez aditou o anexo III do Decreto-Lei n.º 560/99 de 18 de Dezembro, que estabelece as regras a que deve obedecer a rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. O Decreto-Lei n.º 126/2005, relativo à indicação dos ingredientes presentes nos géneros alimentícios, estabelece a obrigatoriedade de fazer uma referência clara no rótulo ao nome de qualquer ingrediente que continue presente no produto acabado quando se trata de “cereais que contêm glúten, nomeadamente trigo, cevada, centeio, cevada, aveia, espelta, *Kamut* ou as suas estirpes híbridas. Ou seja produtos à base de cereais, têm de ser rotulados, a fim de proteger os consumidores contra as reacções adversas [23,36,42].

A norma do Codex para alimentos isentos de glúten foi aprovada em 1976 pela Comissão do *Codex Alimentarius*. Em 1981 e em 2000 procedeu-se à revisão do projecto de normas e os denominados alimentos sem glúten são descritos como: (a) constituídos por, ou elaborados apenas a partir de ingredientes que não contêm qualquer prolaminas de trigo ou de todas as espécies de *Triticum*, tais como espelta, *kamut* ou trigo duro, centeio, cevada, aveia ou as suas variedades híbridas com um nível glúten que não exceda os 20 ppm, ou (b), elaborado com ingredientes a partir de trigo, centeio, cevada, aveia, espelta ou suas variedades híbridas, que foram tornadas sem glúten; glúten com um nível não superior a 200 ppm, ou (c) qualquer mistura dos dois ingredientes, no (a) e (b) mencionados, com um nível não superior a 200 ppm [4,25,27,31,32,35,38,43].

A quantidade máxima permitida de gliadinas nos alimentos para estes serem considerados isentos de glúten de acordo com a Comissão do *Codex Alimentarius* é de 100 ppm (10 mg gliadinas/100 g de alimento) o que equivale a 200 ppm de glúten. Contudo alguns investigadores consideram este nível elevado para proteger a população susceptível. Segundo a Comissão do Codex, a ingestão de 10 mg gliadina/dia não deve ser ultrapassada por grupos susceptíveis [44].

O desenvolvimento da legislação sobre os níveis de glúten admissível em alimentos rotulados como “sem glúten” tem sido dificultado pela falta de um adequado método de análise. O que torna a legislação nesta matéria inespecífica e susceptível de controversa [45].

Recentemente, a Comissão do *Codex Alimentarius* (2008), aprovou novas normas para os alimentos sem glúten. Segundo esta norma, o glúten é definido como “ fracção proteica do trigo, cevada, centeio e aveia, suas variedades cruzadas e derivados, a que algumas pessoas são intolerantes e que é insolúvel em água e numa solução de 0,5 M de cloreto de sódio”. Um alimento “sem glúten” é definido como “um produto que contém menos de 20 mg de glúten /kg de alimento e 100 mg de glúten / kg de alimento no caso de alimentos especialmente produzidos para reduzir o teor de glúten para um nível compreendido entre 20 e 100 mg/kg” [36,42,45].

Segundo o Regulamento (CE) n.º 41/2009 da Comissão de 20 de Janeiro de 2009 relativo à composição e rotulagem dos géneros alimentícios destinados a pessoas com intolerância ao glúten, os alimentos com um teor glúten inferior a 20 mg/kg de alimento podem ostentar a menção “isento de glúten”; os alimentos com um teor de glúten compreendido entre 20 e 100 mg/kg no alimento ostentam a menção de “teor muito baixo de glúten”. As menções «teor muito baixo de glúten» ou «isento de glúten» devem figurar próximo da denominação de venda do alimento. Este regulamento é aplicável em todos os Estados-Membros a partir de 1 de Janeiro de 2012 [46].

## 1.5. MÉTODOS DE DETECÇÃO E ANÁLISE DO GLÚTEN

O glúten pode estar presente em muitos produtos, elaborados a partir de farinhas de trigo, centeio, cevada e aveia, como no pão, massas, bolachas, papás, cereais, mas também pode ser adicionado a um produto como ingrediente, aditivo ou devido a razões tecnológicas do processo de fabricação. Os métodos para a análise de glúten confrontam-se com diferentes problemas, tais como a natureza heterogénea dos alimentos, composição variável do glúten e dificuldade de quantificar produtos processados aquecidos ou quando o glúten estiver parcialmente hidrolisado [29].

Assegurar que um alimento é livre de glúten é de extrema importância para os doentes celíacos sendo imperativa a necessidade de novos métodos analíticos de glúten com sensibilidade, selectividade, fiabilidade, baixo custo, rápidos e validados [19]. A

disponibilidade de produtos alimentares isentos ou com baixo teor de glúten (abaixo de 4 mg de glúten/100 g de alimento, 40 ppm) é fulcral para a qualidade de vida dos pacientes que sofrem de doença celíaca. No entanto, os produtos alimentares comerciais declarados, frequentemente, como isentos de glúten podem ser frequentemente contaminados por glúten (numa escala de 20-200 ppm) [19,47].

As técnicas seguintes são frequentemente utilizadas para detectar, fraccionar e/ou quantificar proteínas de trigo: eletroforese em géis de poliacrilamida (A-PAGE e SDS-PAGE) [7,19,37,48-50], cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC) e exclusão de tamanho (SE-HPLC) [6,7,13,26,32,34,37,38,44,48-56], eletroforese capilar (CE) [32,48,52], ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) [14,17,21,24,26,27,29,31,32,34,36-38,43,44,55,57], ensaios de imunofluorescência competitivos homogêneos para a determinação da gliadina utilizando gliadina marcada como térbio [32], espectroscopia de correlação de fluorescência [21], espectroscopia de massas MALDI-TOF [26,31,32,41,43,55,58], métodos baseados em ADN tais como, reacção em cadeia da polimerase (PCR e RT-PCR) [25,28,32,36,55], citometria de fluxo acoplada a um fluxo de anticorpos de rato contra a um péptido de 16-resíduos da gliadina [35].

Os tratamentos térmicos, aplicados na transformação de alimentos, não afectam a toxicidade da prolamina mas podem afectar a sua quantificação. Os efeitos do tratamento térmico dependem das condições aplicadas de tempo e temperatura do tratamento, bem como as características da matriz do produto alimentar e do método utilizado [19]. Não obstante, os métodos imunquímicos são as ferramentas mais utilizadas [19,34]. Presentemente, a técnica de ELISA que utiliza o anticorpo monoclonal para  $\omega$ -gliadina, que são estáveis ao calor [59], é considerada, o método oficialmente aceite pela *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC). O limite detecção é de 160 ppm de gliadina, possui baixa sensibilidade para a aveia e cevada e não detecta as prolaminas do arroz e milho [57,60]. Um novo método para a análise de glúten, ELISA tipo sanduíche que utiliza o anticorpo monoclonal R5 contra o pentapéptido tóxico GGFPF e sequências homólogas repetitivas no glúten, foi desenvolvido. Este método denominado de R5-ELISA, é capaz de identificar gliadinas, hordeinas e secalinas com sensibilidades de 0,78, 0,39 e 0,39 ng/ml, respectivamente. Os limites detecção foram 1,5 ng gliadinas/ml (1,56 ppm gliadinas, 3,2 ppm de glúten).

Também foi capaz de detectar gliadinas e hordeinas, em produtos a base de trigo e cevada transformados e não transformados pelo calor [57,62,63].

No entanto, os “kits” actualmente disponíveis para a medição de glúten são: (i) ensaios ELISA tipo sanduíche; (ii) não detectam de modo equivalente o glúten nos diversos cereais; (iii) não são específicos para a gliadina tóxica da doença celíaca; (iv) não detectam as formas hidrolisadas da gliadina; (v) são destruídos pelos agentes redutores comumente utilizados para extrair o glúten dos alimentos (os quais desnaturam os anticorpos e as marcações enzimáticas) [27].

Recentemente relatou-se o uso da citometria de fluxo na detecção de níveis de gliadinas abaixo dos 10 pg/ml [35], bem como um ensaio de espectroscopia de fluorescência de correlação, relatando um limite de detecção de 0,006 ppm de glúten inferior a 3,2 ppm recentemente relatado para R5-ELISA [21].

Também se encontra documentado na literatura, a detecção de glúten pela PCR, em amostras de farinha de cereais e em produtos de panificação sem glúten, com limites de detecção de 0,1% (w/w), um valor aproximadamente equivalente ao limite de 10 mg por 100g de glúten proposto pelo *Codex Alimentarius* [25]. O método de PCR selectivo para a amplificando um fragmento de 135 pb do gene para detectar ADN de glutenina trigo numa infinidade de matérias-primas e alimentos processados termicamente O limite de detecção foi de 21,5 pg de ADN. A ausência de amplificação nos cereais como a aveia, centeio, cevada e milho torna este método exclusivo para a detecção de trigo [24]. Ensaio de PCR em tempo real, usando as sondas TaqMan<sup>®</sup>, foram aplicados para a detecção de glúten em diferentes cereais, obtendo sensibilidades de 2,5 mg/kg e 5 mg/kg de trigo, em matrizes à base de produtos vegetais e a base de carne, respectivamente [36].

O método de análise por HPLC permite quantificar os diferentes tipos de proteínas do glúten. Em diferentes farinhas de diferentes espécies de trigo a percentagem de gliadinas totais está compreendida entre 64,5-86,8%. As  $\alpha$ -gliadinas são as que apresentam maiores proporções (28-45,3%), seguidas das  $\gamma$ -gliadinas (21-31,3%) e as  $\omega$ -gliadinas encontram-se em menor quantidade (6,4-14,8%) [64].

Sendo também considerado um método preciso para a determinação quantitativa de gliadinas e gluteninas em farinhas de trigo em produtos processados termicamente, permitindo excelentes recuperações de gliadina. Portanto, pode ser usado como um eficiente método de controlo para os ensaios imunoquímicos [38]. Após a adaptação do

método para amostras pobres em glúten, o limite de detecção pode ser cerca de 20 µg de proteína glúten por grama de farinha de glúten, que é consideravelmente inferior ao valor máximo proposto pela norma do Codex para alimentos sem glúten. [38]

A análise de glúten é desafiadora porque o glúten é uma mistura de proteínas insolúveis em água, derivado dos grãos de trigo, cevada ou centeio, que em alimentos comerciais, está envolvido numa gama de diversas matrizes e é modificado pelo calor e processamento [29]. Neste sentido, é de extrema importância desenvolver métodos analíticos de fácil utilização, económicos, simples e sensíveis para detectar proteínas em produtos alimentares, nomeadamente as gliadinas, que são responsáveis pela doença celíaca.

Relativamente ao diagnóstico da DC podemos mencionar alguns trabalhos, tais como, o desenvolvimento de um “imunossensor impedimétrico” para a detecção de anticorpos anti-gliadinas [18], um biossensor de fibras ópticas para a detecção de anticorpos anti-gliadinas [65] e sobre a implementação de um imunossensor electroquímico para diagnosticar a doença celíaca, tendo por base a detecção de anticorpos de transglutaminase tecidular em soro humano [20]. No que diz respeito, ao desenvolvimento de sensores para análise de glúten em alimentos pode-se consultar na literatura dois trabalhos [41,66], que mostraram o desenvolvimento e aplicação de um microsensor óptico de proteína interferométrica, tendo por base uma superfície nanoestruturada de silicone poroso modificada quimicamente que ligam covalentemente proteína de ligação da glutamina (GlnBP) da *Escherichia coli*, para a detecção de vestígios de gliadina e outras prolaminas nos alimentos. A resposta do sensor para a concentração de proteína foi medida numa gama de 2,0-40 µg/L e a sensibilidade do método foi 45%.

O crescente interesse em relação à aplicação do sistema multi-sensor na área alimentar pode ser, em parte, atribuído aos baixos custos de calibração, à precisão satisfatória para tamanhos relativamente pequenos do conjunto de dados da calibração e a fácil adaptabilidade a diferentes condições de trabalho, quando comparado com outras metodologias analíticas [67].

Nassef et al. (2008) desenvolveram um imunossensor electroquímico para a detecção de gliadinas em alimentos. Foram estudadas duas superfícies químicas para a captura e estabilidade do anticorpo monoclonal anti-gliadina. Os limites de detecção obtidos para as superfícies químicas 1 e 2 foram de 5,5 e 11,6 ng/mL, respectivamente.

Este imunossensor quando aplicado às análises de produtos alimentares sem glúten e com glúten apresenta correlações excelentes, em comparação com o teste de ELISA. O imunossensor desenvolvido é muito sensível, detecta baixos níveis de gliadinas (ppb), quantitativos fiáveis e a detecção do conteúdo de gliadina pode ser atingido dentro de 90 minutos, com um mínimo de exigência de manipulação do operador [45].

Na literatura, encontram-se descritos várias metodologias para extrair e fraccionar as proteínas do glúten. Na extração da gliadinas usualmente utilizam-se soluções aquosas de etanol a 60-70% (v/v) [14,21,22,33,35,38,43,68,69], ou soluções a 40% etanol (v/v) [28,17,31,37] ou com 50% 1-propanol [49,52]. As gluteninas, proteínas insolúveis em soluções de etanol a 60-70%, sendo normalmente extraídas em solução aquosa de 50% (v/v) 1-propanol contendo Tris-HCl (0,05 mol/L, pH 7,5), ureia (2 mol/L) e (1%) DTT a 60°C ou 2-mercaptoetanol [70].

O método de extração de gliadinas, proposto por Bietz e colaboradores (1984), foi utilizado neste trabalho devido à sua simplicidade, reduzido custo, rapidez (sem tempos longos de incubação das amostras) e resultados aceitáveis na análise por RP-HPLC. Este método foi utilizado, para diferenciar gliadinas extraídas de grão de trigo ou de amostras de farinha, permitindo a identificação das variedades de trigo [68].

A maior parte dos produtos alimentares comerciais podem conter proteínas modificadas, como consequência de tratamentos térmicos, alterações no pH, química e hidrólise enzimática e de alta pressão durante os processos de fabricação. No caso dos alimentos que contêm glúten, a interacção das prolaminas entre si, ou com outros componentes da matriz alimentar, que ocorrem por interacções covalentes (pontes disulfeto) e não-covalentes estabelecidas durante a formação da massa, pode provocar uma redução substancial das proteínas e sua recuperação nas amostras, representando uma desvantagem adicional na análise de alimentos sem glúten. [34]

## 1.6. SISTEMA DE MULTI-SENSORES

Na indústria alimentar a caracterização de amostras complexas é realizada com a aplicação de diversas técnicas analíticas baseadas principalmente na separação eficiente de compostos, por exemplo, HPLC, espectroscopia, GC [76,78]. Contudo estas técnicas são demoradas, caras, requerem equipamento especializado e o pré-tratamento da amostra [78].

Os sensores químicos dos sistemas analíticos de multisensores podem ser aplicados nos mais modernos sistemas analíticos, em geral, não necessitam de pré-tratamento da amostra, permitindo não só a discriminação das propriedades das características das amostras de alimentos mas também e avaliar a qualidade global dos alimentos [76,78]. No entanto, requerem sofisticados métodos quimiométricos para analisar os dados ou perfis de sinais medidos pelo sistema de multi-sensores, tais como ferramentas de reconhecimento de padrões: análise de componentes principais (PCA) [73,77]; análise discriminante linear (ADL) [76]; redes neurais artificiais (ANN) [76,77], regressão parcial dos mínimos quadrados (PLS), modelação independente por analogia de classes (SIMCA) [75,78].

Nos sistemas de multi-sensores podem ser utilizados diferentes sensores com vários princípios de funcionamento, sendo os mais frequentes os potenciométricos [71,77], amperométricos [77] e voltamétricos [71]. Estes sistemas podem ser preparados com diferentes materiais, como por exemplo, eléctrodos de vidro de calcogênio [64,67,74], óxidos e membranas cristalinas [77], membranas à base de polímeros orgânicos plastificados contendo diferentes substâncias activas [77], membranas sensíveis a catião ou anião [64], fios de metais preciosos e raros como Au, Ir, Pd, Pt, Re, Rh [71] e filmes poliméricos [72,73].

O número de sensores utilizados num sistema de multi-sensores depende da função analítica e de quantos materiais diferentes estão disponíveis. O número de sensores pode variar de 4 a 40. Tipicamente, um sistema de multi-sensor contém número elevado de unidades de sensores, o que permite a sua aplicação a diferentes funções analíticas [77].

## 1.7. OBJECTIVOS

O glúten é uma mistura de proteínas presentes em diversos cereais e derivados (trigo, centeio, cevada, aveia, entre outros) e podem ser classificadas em dois grupos, as prolaminas e as glutelinas. As prolaminas responsáveis pela intolerância dos pacientes celíacos são: as gliadinas do trigo, as secalinas do centeio, as hordeínas da cevada e as aveninas da aveia.

Assegurar que um alimento está livre de glúten é de vital importância para o doente celíaco, sendo imperativo o desenvolvimento de métodos analíticos robustos

para a sua detecção e quantificação. Neste trabalho utilizou-se um sistema de multi-sensores contendo membranas poliméricas de sensibilidade cruzada a constituintes, para analisar a presença ou ausência de gliadinas em produtos alimentares. Paralelamente foi implementado e validado um método de cromatografia líquida de alta resolução, que permitiu corroborar a presença ou não de gliadinas na composição dos alimentos analisados e estabelecer regras de classificação entre os alimentos com o novo sistema de multi-sensores.

Assim sendo, como objectivos específicos pretendeu-se:

- Optimizar um método de cromatografia líquida (HPLC) para a detecção/quantificação de gliadina em alimentos;
- Aplicar uma sistema de multi-sensores na discriminação de alimentos “com” e “sem glúten”, através da presença ou ausência de gliadinas;
- Estudar a sensibilidade do sistema de multi-sensores a diferentes concentrações de gliadinas adicionadas a um alimento.

---

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

2.1. AMOSTRAGEM

2.2. MÉTODO DE ANÁLISE DE GLIADINAS EM ALIMENTOS POR HPLC

2.3. MÉTODO DE ANÁLISE DE GLIADINAS EM ALIMENTOS POR SISTEMA DE MULTI-SENSORES

Neste capítulo apresenta-se a descrição da amostragem efectuada, bem como, os reagentes, o equipamento, os procedimentos e as condições experimentais usadas nos métodos aplicados na análise das gliadinas.

## 2.1. AMOSTRAGEM

As amostras dos alimentos foram adquiridas em supermercados, tendo em conta a informação presente nos rótulos. Foram estudados 15 alimentos no total: 8 alimentos com glúten (farinha 1, farinha 2, papa 1, papa 2, pão 1, bolacha “Maria” 1, bolacha 1, cereal de pequeno-almoço 1) e 7 alimentos sem glúten (papa 3, papa 4, farinha 3, cereal de pequeno-almoço 2, bolacha “Maria” 2, bolacha 2, pão 2).

## 2.2. MÉTODO DE ANÁLISE DE GLIADINAS EM ALIMENTOS POR HPLC

Descrevem-se, a seguir, o equipamento, reagentes e solventes, os padrões, o modo de preparação de soluções e extractos, bem como, as condições cromatográficas usadas.

### 2.2.1. Equipamento

As análises foram realizadas num sistema cromatográfico constituído por um cromatógrafo marca ProStar, equipado com uma bomba Varian Prostar 220 e um injector manual Rheodyne modelo 7725i provido de loop de 10  $\mu$ L. A detecção foi feita com um detector Varian ProStar 330 Photodiode Array. Na aquisição e tratamento dos dados utilizou-se o Software Star Chromatography Workstation, versão 4,5.

A separação cromatográfica foi conseguida usando uma coluna cromatográfica PLRP-S, da marca Poymer Laboratories, constituída por um polímero de poliestireno divinilbenzeno (tamanho de partículas 8  $\mu$ m, de poro 300 Å, 150×4,6 mm d.i.). A coluna foi colocada no interior de um forno marca Jones Chromatography, modelo 7981. Na desgasificação dos eluentes e preparação das amostras utilizou-se um banho de ultra-sons, marca Elma e modelo Transsonic 460/H.

### 2.2.2. Reagentes e Padrões

O padrão de gliadina utilizado foi a “Gliadin from wheat” da Sigma-Aldrich.

Na preparação dos eluentes utilizaram-se reagentes de qualidade analítica sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional. O acetonitrilo (Labscan), foi adquirido à Merck, com uma pureza superior a 99,8%. O ácido trifluoracético (TFA) de pureza mínima de 99%, foi adquirido à Acros Organics. A água desionizada foi obtida através de um sistema de desionização TGI Pure Water Systems. O solvente etanol absoluto utilizado foi adquirido à Panreac.

Todos os solventes foram filtrados usando membranas de nylon de porosidade 0,20 µm e diâmetro 47 mm da Millipore. Todas as amostras e padrões injectados foram previamente filtrados com filtro de nylon de porosidade 0,2 µm e diâmetro 25 mm, Puradisc 25 NYL da Whatman.

### 2.2.3. Quantificação das soluções padrão de gliadina

Na quantificação das soluções padrão utilizou-se um agitador de microplacas da marca StatFax-2100. A leitura das microplacas realizou-se num leitor de microplacas da BioTek Instrument, modelo ELx800 e o registo dos valores das absorvâncias medidas a um comprimento de onda de 595 nm, foi efectuado com o programa Gene5.

Utilizou-se o “Kit” da Pierce, Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay Kit para a quantificação das soluções padrão de albumina (soluções diluídas a partir da solução concentrada fornecida no kit) de acordo com as instruções do fornecedor (anexo A).

### 2.2.4. Preparação de soluções e extractos

A seguir, descreve-se o modo de preparação das soluções padrão de gliadina, da quantificação das soluções padrão de gliadina e dos eluentes para HPLC.

**Preparação das soluções padrão de gliadina.** As soluções padrão de gliadina foram preparadas com diferentes massas de padrão de gliadina (o sólido foi pulverizado antes

de ser usado) e extraídas com uma solução aquosa de etanol a 70% (v/v). As misturas foram homogeneizadas num vortex durante 15 minutos e centrifugadas durante 10 minutos a 5000 rpm.

**Preparação das amostras dos alimentos.** As amostras de farinha e papas foram extraídas directamente, as restantes foram trituradas num triturador até ficarem em pó. O procedimento de extracção das gliadinas dos alimentos encontra-se descrito no ponto 2.3.3 (capítulo 2, secção Material e Métodos). As amostras analisadas por HPLC foram as mesmas analisadas no sistema multi-sensores. Para a análise no HPLC, alíquotas de 1 mL foram filtradas com um filtro de nylon de porosidade 0,2 µm e diâmetro 25 mm (marca Whatman) e guardadas a 4°C. As condições de análise encontram-se descritas no ponto 2.2.5 (capítulo 2, secção Material e Métodos).

**Quantificação das soluções padrão de gliadina por “kit”.** Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante contidas no Kit da Pierce, Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay Kit. O procedimento encontra-se no Anexo A. A leitura da absorvância a 595 nm foi realizada num leitor de microplacas BioTek Instruments, modelo ELx800.

Uma vez que o grau de pureza do padrão comercial de gliadina não ser indicado pela marca procedeu-se à extracção do mesmo e posterior quantificação das soluções de forma a confirmar a concentração final das mesmas.

**Preparação de eluentes para cromatografia líquida.** A separação das gliadinas foi efectuada após a injeção de 10 µl de amostra usando como eluentes 99% de água desionizada, 1% de acetronitrilo e 0,01% TFA (v/v) (solvente A) e 99% acetronitrilo, 1% água desionizada e 0,01% TFA (v/v) (solvente B).

Os eluentes foram filtrados com membrana de nylon 0,2 µm num sistema de filtração de eluentes. Todos os eluentes foram desgaseificados em banho de ultra-sons durante, pelo menos, 15 minutos.

### 2.2.5. Condições cromatográficas para análise de gliadinas

A melhor resolução cromatográfica das gliadinas, após terem sido experimentados diferentes gradientes, foi obtida utilizando o gradiente 20%-80% de solvente B durante 30 minutos. A eluição foi realizada a um fluxo constante de 0,6 ml/min, à temperatura de 40±0,1°C e a detecção foi feita a 210 nm.

### 2.2.6. Identificação dos picos referentes às gliadinas nos cromatogramas das amostras de alimentos

Os picos referentes às gliadinas presentes nos espectros UV das amostras de alimentos analisadas foram identificados por comparação dos tempos de retenção registados para as soluções padrão de gliadinas e por análise do espectro UV associado a cada pico.

Os espectros UV foram registados na gama de comprimento de onda de 190-400 nm, tendo-se verificado que o espectro lido a 210 nm permitia uma maior sensibilidade.

### 2.2.7. Parâmetros analíticos avaliados no método de HPLC

**Limite de detecção e quantificação.** O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração de uma substância que pode ser detectada, utilizando um dado procedimento experimental. A menor concentração de uma substância que pode ser quantificada, utilizando um procedimento experimental, denomina-se de limite de quantificação (LQ) [83,84].

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados através de parâmetros da curva analítica. Os LD e LQ foram determinados usando as equações 1 e 2, respectivamente:

$$LD = 3,3 \times \left( \frac{s}{m} \right) \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times \left( \frac{s}{m} \right) \quad (2)$$

onde:  $s$  é o desvio padrão da resposta, que pode ser o desvio padrão do branco, da ordenada da origem da equação da recta ou da equação da recta da regressão linear;  $m$  é o declive ou coeficiente angular da curva analítica.

**Precisão.** A precisão avalia a dispersão de resultados de uma série de medições repetidas a uma mesma amostra, a amostras semelhantes ou a uma solução padrão, em condições definidas. É normalmente avaliada usando o valor do desvio padrão relativo (DPR%, também conhecido como coeficiente de variação, CV%), em circunstâncias específicas de medição, como a repetitividade, e a precisão intermédia.

Normalmente, métodos que determinam substâncias em macro quantidades requerem um CV% de 1 a 5%. Em métodos de análise de quantidades residuais, aceitam-se CV% até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Ribani *et al.*, 2004). Os critérios experimentais usados na avaliação da precisão são a seguir referidos para: a) repetibilidade; b) precisão intermédia.

a) Repetibilidade avalia a dispersão dos resultados de medições sucessivas usando o mesmo método sob as mesmas condições de medição, ou seja, usando o mesmo procedimento, com o mesmo técnico e equipamento analítico e usando as mesmas condições experimentais do mesmo laboratório. As repetições devem ser realizadas num curto intervalo de tempo. Para o estudo da repetibilidade, o Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial do Brasil (INMETRO) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão, enquanto a “International Conference on Harmonisation” (ICH) e ANVISA sugerem que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações para três níveis de concentrações (três repetições cada) ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração próxima do valor esperado [83,85].

b) Precisão intermédia é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório. Avalia o efeito das variações dentro do laboratório associadas a medições em diferentes dias ou com diferentes analistas ou com diferentes equipamentos ou com uma combinação destes factores. Para determinar a precisão intermédia de um método, efectua-se “n” medições de uma solução amostra e padrões, de vários níveis de concentração, em vários dias (de acordo com o número de

ensaios descritos na medição da repetibilidade). A precisão intermédia é também avaliada através do valor do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV%) dos resultados das análises repetidas nas condições acima referidas [83,85].

### 2.3. ANÁLISE DE GLIADINAS EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS POR SISTEMA MULTI-SENSORES

A seguir descrevem-se os equipamentos, reagentes e a preparação das soluções e extractos usados na análise de gliadinas em amostras de alimentos com o sistema de multi-sensores potenciométricos.

#### 2.3.1. Equipamento

Todas as pesagens das amostras dos alimentos analisados bem como do padrão de gliadina foram efectuadas numa balança analítica da marca KERN, modelo ASS 220-4, com precisão de  $\pm 0,1$  mg.

Nas extracções de gliadinas das amostras dos alimentos estudados e do padrão de gliadina utilizou-se um Vortex, modelo VM2 CAT 230V e uma placa magnética VELP Scientifica. Nas etapas de centrifugação utilizou-se uma centrífuga refrigerada Centurion K<sub>2</sub>R Series.

#### 2.3.2. Reagentes e Solventes

Todos os reagentes e os solventes utilizados nos ensaios realizados foram de grau analítico e utilizados como fornecidos. O solvente etanol absoluto utilizado foi adquirido à Panreac.

Todas as soluções foram preparadas usando água desionizada, obtida a partir de um sistema de desionização TGI Pure Water Systems.

O padrão de gliadina utilizado foi a “Gliadin from wheat” da Sigma-Aldrich.

As 36 membranas poliméricas, utilizadas na construção do sistema multi-sensor, foram preparadas com aproximadamente 31,9-32,3% de PVC, 64,7-65,2% de

compostos plastificantes e 2,8-3,2% de compostos aditivos. Na Tabela 2 indicam-se os compostos aditivos e plastificantes utilizados.

Tabela 2. Aditivos e plastificantes usados na preparação das membranas poliméricas.

<b>Composto aditivo</b>	<b>Identificação do composto aditivo</b>	<b>Composto plastificante</b>	<b>Identificação do composto plastificante</b>
Octadecilamina	1	Fatalato de Bis (2-ethyl-hexilo)	A
Fosfato de Bis (2-ethyl-hexilo)	2	Adipato de Bis (1-butyl-pentilo)	B
Álcool oleílico	3	Fosfato de Tris (2-ethyl-hexilo)	C
Cloreto de metil-trioctil-amónio	4	Sebacato de dibutilo	D
Cloreto de tridodecil-metil-amónio	5	2-Nitrofenil-octil-éter	E
Ácido oleico	6	Fosfato de dioctil-fenilo	F

### 2.3.3. Preparação de soluções e extractos

Neste trabalho utilizou-se uma solução aquosa de etanol a 70% (v/v) como solução de extracção das gliadinas presentes nos alimentos. A referida solução foi preparada, diluindo 70 mL de etanol absoluto até um volume final de 100 mL com água desionizada.

Neste trabalho experimental, fizeram-se duas experiências que envolvem procedimento de extracção de gliadinas dos 15 alimentos adquiridos ou de 1 alimento sem glúten, ao qual foi adicionado concentrações diferentes de padrão de gliadinas.

Na experiência 1, pretendeu-se quantificar gliadinas nos produtos alimentares (com e sem glúten) em estudo e verificar se a informação contida no rótulo era a correcta utilizando o método HPLC-RP e discriminar os alimentos com e sem glúten através da presença ou ausência de gliadinas, utilizando o sistema de multi-sensores. Na

experiência 2, pretendeu-se estudar a sensibilidade do sistema multi-sensor e se podia ser usado para diferenciar matrizes alimentares com diferentes concentrações de gliadinas adicionadas de modo semi-quantitativo.

**Experiência 1:** Neste ensaio utilizaram-se as 15 amostras de alimentos (com e sem glúten). Para tal, foram extraídas gliadinas de 12 g de cada alimento com 60 mL de solução aquosa de etanol a 70% (método de Bietz e colaboradores (1984), com algumas modificações) durante 30 minutos com agitação constante numa placa magnética à temperatura ambiente. A mistura resultante foi decantada e posteriormente centrifugada a 5000 rpm à temperatura ambiente durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e posteriormente analisado.

Nesta experiência todas as amostras de alimento foram extraídas em triplicado e analisadas no sistema de multi-sensores e por HPLC. Para a análise no sistema multi-sensores utilizaram-se 35 mL do sobrenadante obtido para cada amostra.

**Experiência 2:** Neste ensaio utilizou-se apenas um alimento sem glúten (confirmado por análise por HPLC), tendo-se escolhido a papa de arroz para crianças. O ensaio consistiu na preparação de várias misturas desta papa com padrão de gliadina. Misturou-se amostra com padrão de gliadinas (m/m) de modo a obter amostras do alimento sem glúten contaminadas com teores pré-estabelecidos de gliadinas: 10 ppm (2 mg de gliadinas em 200 g de papa 4), 20 ppm (4 mg de gliadinas em 200 g de papa 4), 50 ppm (5 mg de gliadinas em 100 g de papa 4), 100 ppm (10 mg de gliadinas em 100 g de papa 4) e 200 ppm (20 mg de gliadinas em 100 g de papa 4). Como controlo negativo utilizou-se uma amostra da papa 4 sem glúten à qual não foi adicionada qualquer quantidade de gliadina.

Adicionaram-se 4 g de cada mistura a 40 mL solução aquosa de etanol a 70% (v/v) e misturou-se num vortex durante 15 minutos. Prepararam-se 10 amostras de papa sem adição de gliadinas e das restantes misturas, 5 amostras de cada uma, respectivamente, obtendo-se no total 35 amostras. As amostras foram guardadas a 4°C durante a noite e analisadas no dia seguinte no sistema multi-sensores. Antes de cada análise a amostra foi agitada num vortex durante alguns segundos.

### 2.3.4. Análise com o sistema de multi-sensores

As medições foram efectuadas com um sistema de multi-sensores e um eléctrodo de referência de Ag/AgCl de dupla junção (solução externa de  $\text{KCl}_3$  mol/L) acoplados a um sistema de aquisição de dados, da marca Agilent, modelo 34970A. A aquisição dos sinais registados por cada sensor foi efectuada recorrendo ao software “Agilent BenchLink Data Logger” controlado por um computador. Os dados obtidos foram analisados e visualizados recorrendo ao software “Excel”. As experiências foram efectuadas a  $25^\circ\text{C}$ , numa célula de vidro de parede dupla com uma capacidade de  $50\text{ cm}^3$ . O aquecimento do interior da célula de vidro, onde cada amostra a analisar era colocada, foi efectuado por circulação de água quente na camisa exterior, proveniente de um banho termostatizado. O banho termostatizado encontra-se munido de uma cabeça de aquecimento (Selecta Tectron Bio) com circulação interna e externa de água. A cabeça de aquecimento permite uma estabilidade de  $\pm 0,01^\circ\text{C}$ , permitindo manter a temperatura da água de aquecimento da célula de vidro com um rigor de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Na Figura 2 pode observar-se o equipamento experimental utilizado.

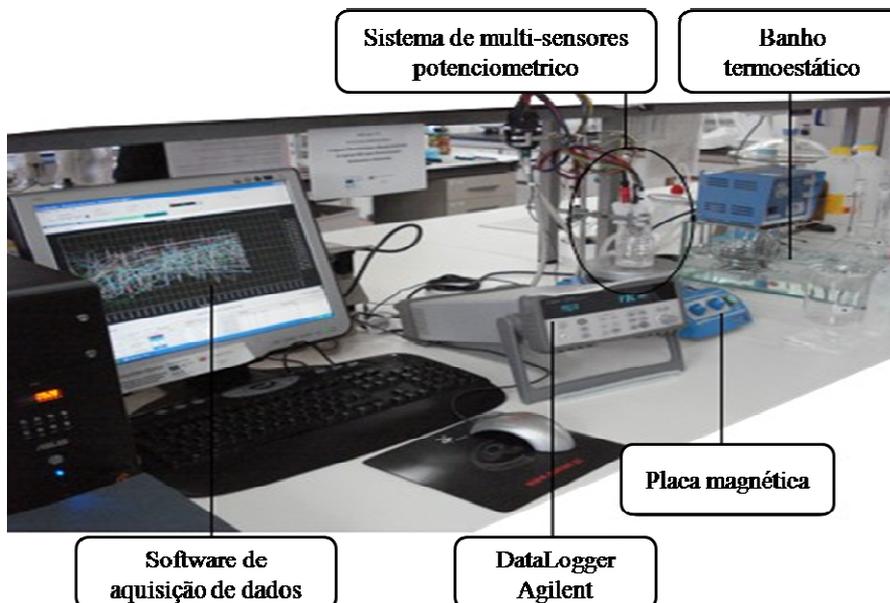


Figura 2. Esquema da instalação experimental na análise recorrendo ao sistema de multi-sensores.

Construíram-se 2 sistemas de multi-sensores em corpos cilíndricos de acrílico (diâmetro de 1,5 cm e altura de 6 cm). Cada sistema possui 20 poços em contacto com uma resina epóxi ou poliepóxido condutora de prata (EPO-TEK E4110). As misturas das membranas poliméricas foram adicionadas, gota a gota, até o poço estar completamente preenchido. O resultado final é uma membrana transparente e brilhante, ligeiramente amarelada. Em cada sistema adicionaram-se 18 membranas poliméricas (nos restantes 4 poços procedeu-se à adição das misturas de membranas poliméricas cuja membrana após a adição inicial apresentava um aspecto visual cristalino). No primeiro sistema as membranas foram preparadas com combinações entre os 6 compostos aditivos e 3 dos compostos plastificantes (A, B e C). No segundo sistema as membranas poliméricas são constituídas com combinações dos 6 compostos aditivos e dos restantes 3 compostos plastificantes (D, E e F).

Na Figura 3 mostra-se o sistema de multi-sensores conjuntamente com o eléctrodo de referência Ag/AgCl, que foi utilizado nas experiências realizadas.

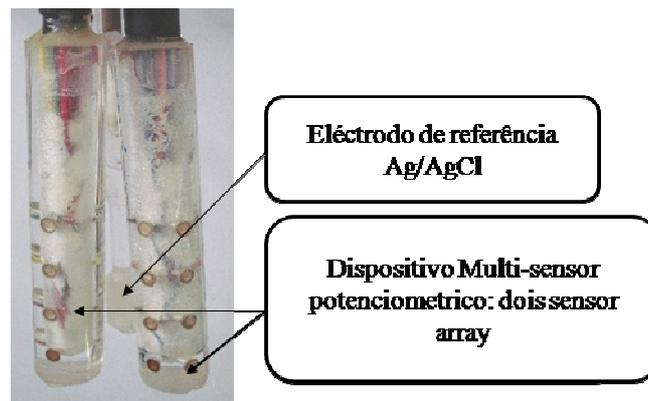


Figura 3. Sistema de multi-sensores e o eléctrodo de referência Ag/AgCl.

Os dados experimentais obtidos com o sistema multi-sensores foram utilizados para desenvolver um modelo de previsão linear capaz de discriminar amostras alimentares “com” e “sem gliadinas” na sua composição. Para tal recorreu-se a uma técnica estatística multivariada supervisionada, tendo-se seleccionado a análise discriminante linear (ADL), com o objectivo de obter regras de classificação que permitam a diferenciação entre os alimentos “com” e “sem glúten”. Esta técnica é aplicada quando a variável dependente é qualitativa (grupos de alimentos com e sem glúten) e as variáveis independentes são quantitativas (sinais registados pelos sensores). O método permite seleccionar as variáveis independentes que distinguem os grupos,

permitindo que caso se conheçam as características de um novo caso se possa prever a que grupo pertence. O processo baseia-se na obtenção de funções discriminantes, cuja significância é aferida através do teste Wilk's Lambda [79], a partir de combinações lineares das variáveis iniciais, que maximizam as diferenças incorrectas dos casos nos grupos [80]. As probabilidades à prior de cada grupo foram determinadas tendo em conta a dimensão de cada um. O método é supervisionado pois assume um conhecimento prévio do grupo ao qual cada amostra pertence.

A análise discriminante requer a verificação de 2 pressupostos. Cada grupo deve ser uma amostra aleatória de uma população normal multivariada. Os testes de normalidade multivariada são difíceis de implementar e, por isso, a verificação destes pressupostos é feita estudando se os erros não estandardizados do modelo linear seguem uma distribuição normal, recorrendo ao método de Kolmogorov-Smirnov com a correcção de Lilliefors ou ao método de Shapiro-Wilk. Dentro dos grupos a variabilidade deve ser idêntica, ou seja, as matrizes de variância e covariâncias são iguais para todos os grupos. A verificação deste pressuposto é feita através do teste M de box [80]. A homogeneidade de variância em cada grupo individual foi testada através do teste Levene. No entanto, convém realçar que a ADL mostra ser uma técnica bastante robusta à violação destes pressupostos. De facto se os referidos pressupostos são violados moderadamente a classificação correcta dos resultados é pouco afectada. Quanto maior o tamanho da amostra, mais robusta a análise é à violação destes pressupostos [81].

As probabilidades foram calculadas a prior com base em cada grupo.

Para obter a classificação mais correcta possível foi usado o procedimento ADL “stepwise” que permitiu seleccionar o grupo de sensores que permitiram uma maior diferenciação.

A técnica “stepwise” foi aplicada para a selecção de variáveis, utilizando o método Wilk's Lambda, considerando a probabilidade de F para uma variável ser incluída ou removida de 15% ( $p = 0,15$ ). Este procedimento utiliza uma combinação de selecção “forward” e de procedimentos de “backward”, antes de seleccionar uma nova variável a incluir, e verifica se todas as variáveis previamente seleccionadas permanecem significativas.

O desempenho da ADL foi verificado para a classificação de todas as amostras nos grupos originais, recorrendo as funções discriminantes obtidas com base na informação de todas as amostras analisadas. Para verificar se o desempenho desta

técnica não é sobre-estimado, procedeu-se a uma validação cruzada dos resultados de classificação obtidos. De entre os procedimentos de validação existentes, o mais comum é o método da validação cruzada “leaving-one-out”. Nesta metodologia, a classificação de uma dada amostra num dos grupos pré-definidos é feita recorrendo a funções discriminantes estimadas sem a sua contribuição. O objectivo é seleccionar e testar a capacidade do modelo de forma a evitar a selecção de modelos cujo ajuste aos dados existentes é muito satisfatório mas cujo desempenho perante novos caso é bastante insatisfatório.

Para os dois procedimentos, dados originais e validação cruzada, a sensibilidade e especificidade do modelo discriminante final foram calculadas através do número de amostras classificadas correctamente como pertencendo a um grupo específico.

A análise estatística, relativa à ADL, foi efectuada a um nível de significância de 5%, utilizando o software de SPSS versão 17,0 (SPSS Inc) [79,81].

---

# **CAPÍTULO 3**

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

3.1. ANÁLISE DE GLIADINAS POR HPLC

3.2. ANÁLISE DOS ALIMENTOS COM  
SISTEMA DE MULTI-SENSORES

O trabalho desenvolvido teve dois objectivos principais: optimização e implementação de um método cromatográfico para a detecção e quantificação de gliadinas em produtos alimentares e, avaliar a capacidade de um sistema de multi-sensores para discriminar alimentos com e sem glúten e determinar semi-quantitativamente o teor de gliadinas. De seguida, apresentam-se os resultados obtidos.

### 3.1. ANÁLISE DE GLIADINAS POR HPLC

A calibração do sistema HPLC foi efectuada utilizando soluções padrão de gliadinas preparadas a partir do padrão adquirido à Sigma-Aldrich (“Gliadin from wheat”). As soluções foram obtidas por dissolução de diferentes massas conhecidas de padrão em misturas de etanol/água (70:30 v/v). Em virtude de se ter verificado a não dissolução completa das massas de padrão de gliadinas utilizadas, o que pode ser devido à presença de impurezas no padrão comercial, as concentrações finais de cada solução padrão preparada foram determinadas recorrendo à quantificação da proteína presente em cada solução através do Kit “Coomassie Plus assay reagent”. Todos os alimentos estudados neste trabalho foram analisados por HPLC com o objectivo de verificar quais os alimentos que continham gliadinas na sua composição, bem como, para determinar a concentração de gliadinas nos mesmos.

#### 3.1.1. Quantificação das soluções padrão por Kit “Coomassie Plus assay reagent”.

As concentrações das várias soluções padrão de gliadinas utilizadas para obter a curva de calibração do sistema de HPLC foram determinadas por análise colorimétrica utilizando o kit “Coomassie Plus assay reagent” (Pierce) de acordo com as instruções do fornecedor e recorrendo à leitura das absorvâncias num leitor de microplacas a um comprimento de onda de 595 nm. De acordo com as instruções do kit, a recta de calibração foi obtida a partir de soluções de padrão albumina com concentrações entre 0,125 e 2,000 g/L, por diluição de diferentes volumes da solução albumina, fornecida no kit, em etanol a 70%. As soluções padrão foram preparadas em triplicado. A calibração efectuada resulta da utilização dos resultados de todas as repetições. Na Figura 4 mostra-se a representação gráfica das médias das absorvâncias medidas em triplicado para cada solução padrão de albumina em função das suas concentrações.

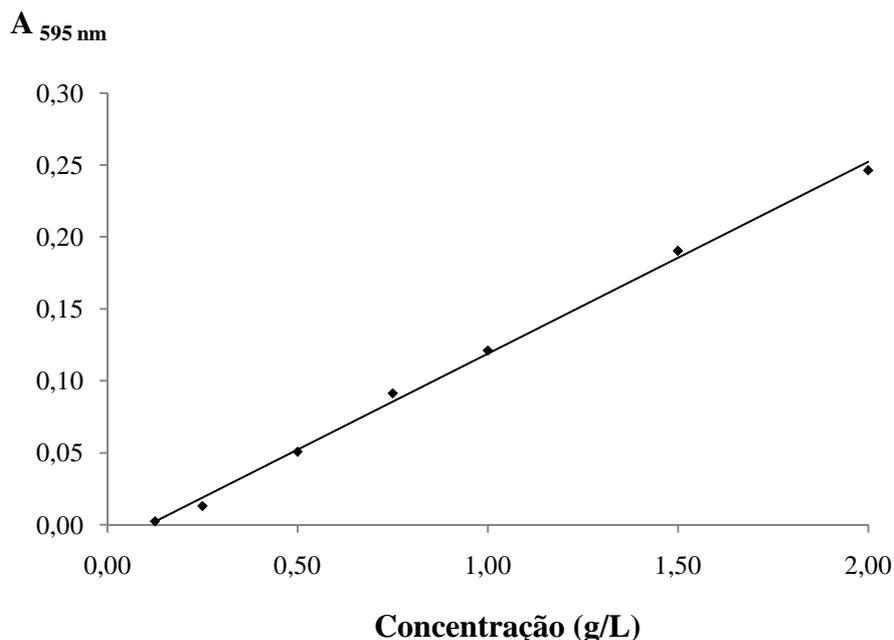


Figura 4. Recta de calibração do padrão albumina (BSA kit Pierce).

A recta de calibração obtida indica-se na seguinte equação 3:

$$S=1,33\times 10^{-4}(\pm 3\times 10^{-6})\times C-1,5\times 10^{-2}(\pm 3\times 10^{-3})\dots\dots\dots(3)$$

sendo, S a absorvância (unidades arbitrárias) e C a concentração (g/L), com um coeficiente de correlação de 0,9986. O valor do coeficiente de correlação é próximo de 1 pelo que o método é linear na gama de concentrações estudada, tal como se verifica no gráfico apresentado. Esta recta foi utilizada para análise e quantificação das concentrações das soluções padrão de gliadina.

As concentrações determinadas para as diferentes soluções padrão de gliadina preparadas foram sempre inferiores às concentrações esperadas com base nas massas de padrão de gliadinas pesadas e no volume final das referidas soluções. Em média, a concentração final de gliadinas nas soluções etanólicas era  $46\pm 20\%$  inferior às concentrações esperadas se toda a massa de padrão de gliadinas comercial utilizado se dissolvesse completamente. A percentagem de dissolução do padrão comercial de gliadinas foi incrementada após pulverização do sólido antes da sua utilização.

## 3.1.2. Linearidade e curva de calibração do sistema de HPLC

Nas condições experimentais descritas no capítulo anterior (ver capítulo Material e Métodos, ponto 2.2.5), verificou-se uma relação linear entre as áreas dos picos referentes à gliadina e a concentração. Na Figura 5, apresentam-se os perfis cromatográficos (detecção a 210 nm) obtidos por HPLC das soluções padrão de gliadinas utilizadas para a recta de calibração.

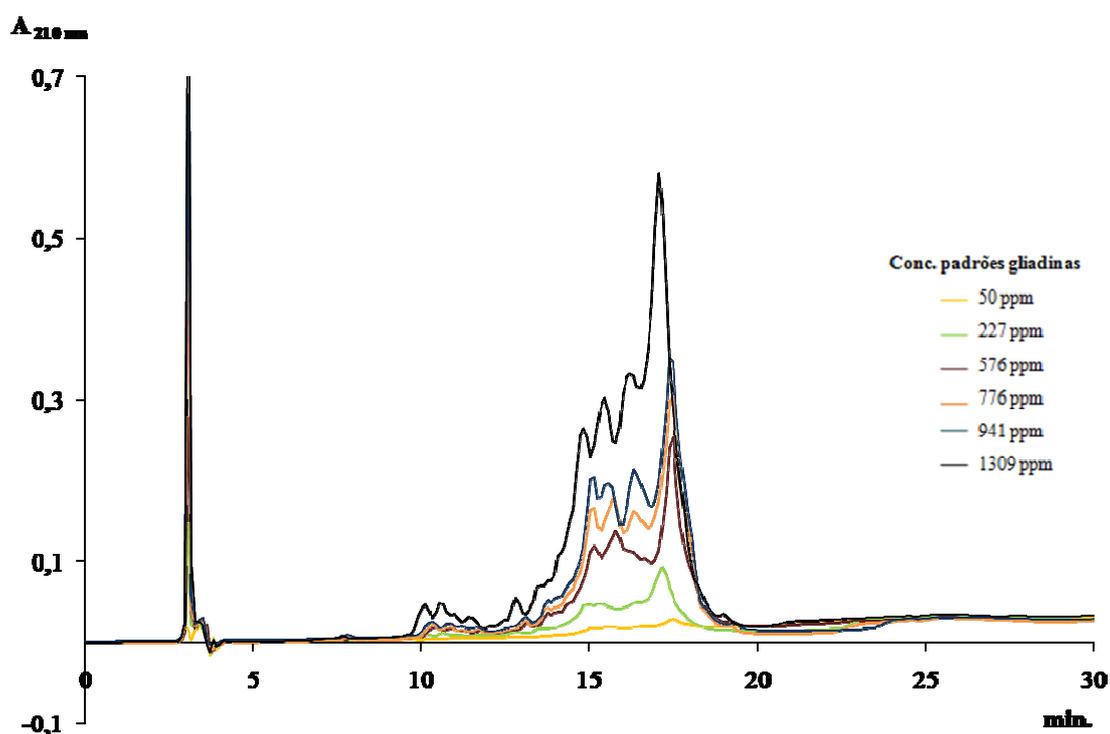


Figura 5. Perfis cromatográficos obtidos por HPLC (210 nm) das 6 soluções de padrão gliadinas utilizadas na elaboração da recta de calibração.

A recta de calibração foi estabelecida pelo método do padrão externo, utilizando 6 soluções padrão de gliadinas preparadas como descrito no ponto 2.2.3 (capítulo Material e Métodos) e cuja concentração final obtida recorrendo ao Kit “Coomassie Plus”, segundo as recomendações do fornecedor (anexo A). O intervalo dinâmico de concentrações estudado foi entre 50 e 1309 ppm de gliadinas. As soluções com concentração inferior a 125 ppm foram obtidas por diluição de soluções mais concentradas. Na Figura 6 mostra-se a representação gráfica da área global dos picos de

gliadinas em função das concentrações das soluções padrão, bem como o ajuste linear obtido. A recta de calibração obtida indica-se na seguinte equação 4.

$$S=2,56\times 10^5(\pm 4\times 10^3)\times C-8\times 10^6(\pm 4\times 10^6) \quad (4)$$

sendo S a absorvância (unidades arbitrárias) e C a concentração (ppm), com um coeficiente de correlação de 0,9993. Os pontos apresentam tendência linear mas com alguma dispersão.

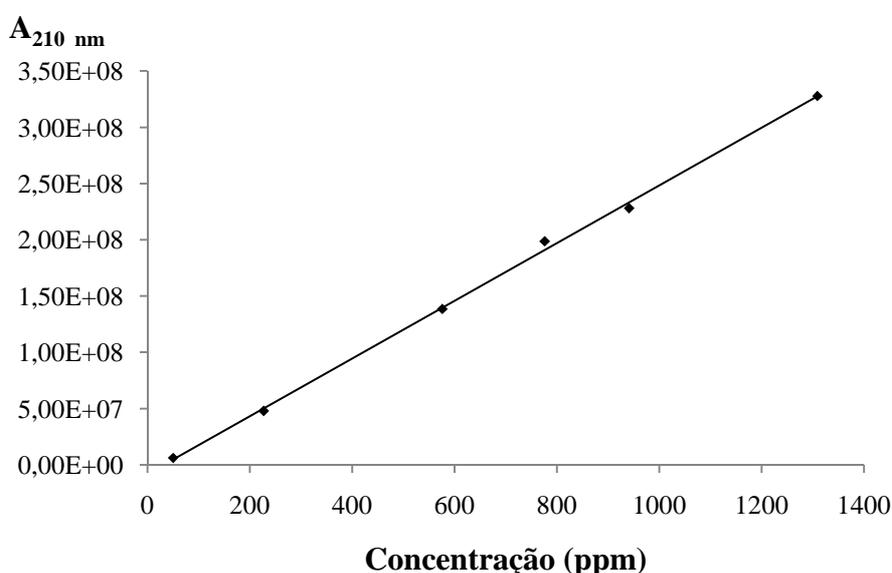


Figura 6. Recta de calibração das soluções padrão de gliadina medidas por HPLC.

#### 3.1.2.1. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são parâmetros importantes pois, indicam a partir de que concentração a substância em análise se detecta ou é possível ser quantificada, respectivamente. O LD e LQ foram calculados através de parâmetros da curva analítica: erro padrão da ordenada da origem da recta de calibração (s) e declive da respectiva recta (m). Os LD e LQ foram determinados usando as equações 1 e 2, (referidas no capítulo 2 Material e Métodos, ver ponto 2.2.7).

O LD e o LQ obtidos foram de 46,5 e 140,91 ppm gliadinas, respectivamente. Estes valores são referentes à área global do conjunto de picos.

O LD foi ainda avaliado qualitativamente a partir da visualização dos perfis cromatográficos e dos respectivos espectros UV obtidos por HPLC, para soluções padrão de gliadinas de concentrações inferiores a 46,5 ppm. Esta análise qualitativa permitiu verificar que soluções com concentrações de gliadinas de 10 ppm ainda apresentavam picos na zona do último subgrupo de gliadinas, permitindo inferir acerca da presença destas últimas em solução. Analisaram-se 8 vezes uma solução padrão de gliadinas com concentração de 10 ppm tendo-se obtido um CV de 6,60% para a área total dos picos detectados. Deste modo, e pese embora analiticamente o LD ter sido fixado num valor superior, é possível afirmar que a técnica analítica implementada permite detectar valores da ordem dos 10 ppm. Em relação ao LQ analisaram-se visualmente os cromatogramas e respectivos espectros UV de soluções padrão de gliadinas com concentrações de 10, 50 e 100 ppm. A análise realizada permitiu constatar que é difícil identificar nos cromatogramas obtidos os limites de integração dos picos iniciais inviabilizando a quantificação dos picos registados para essas concentrações. Assim sendo, o LQ obtido a partir dos parâmetros da recta de calibração é o limite de quantificação da técnica de HPLC implementada.

O limite de detecção obtidos neste trabalho é inferior aos obtidos pelo método oficialmente aceite (ELISA) que apresenta um limite de detecção de 160 ppm [57,60]. No entanto, são superiores quando comparados com o método R5-ELISA, que apresenta limites de detecção na ordem dos 1,56 ppm gliadinas (3,2 ppm de glúten) [57,62,63]. Mas estes métodos podem produzir falsos negativos quando se desnaturam as proteínas por alterações na pressão, temperatura ou concentração de sais e possibilidade de reacções cruzadas entre as proteínas relacionadas. O método de HPLC é considerado um bom método de caracterização e quantificação das diferentes de proteínas do glúten, podendo ser usado como um método de controlo nos testes de ELISA [38]. Em relação aos métodos de citometria de fluxo, espectroscopia de fluorescência de correlação e imunosensor, estes métodos detectam/quantificam valores muito inferiores à técnica standard utilizada, no entanto esta possibilitou quantificar os limites que permitem definir e diferenciar alimentos “com” e “sem glúten”. Contudo os métodos de citometria de fluxo e espectroscopia de fluorescência de correlação são recentes, requerem instrumentação complexa, custo elevado e técnicos especializados.

### 3.1.2.2. Precisão

A precisão caracteriza a dispersão de resultados entre ensaios sob condições definidas e foi avaliada tendo em conta a repetibilidade e a precisão intermédia. A precisão do método foi estudada ao nível da repetibilidade e precisão intermédia.

O estudo da repetibilidade do método consistiu na análise, no mesmo dia, de uma solução padrão de gliadina com uma concentração de 227 ppm. Foi efectuado o cálculo da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação do total das áreas dos picos registados após 5 injeções da solução padrão escolhida tendo-se obtido um coeficiente de variação de 2,5%.

Para o estudo da precisão intermédia injectaram-se 7 vezes a mesma solução padrão (de 227 ppm) em 3 dias diferentes tendo-se obtido um coeficiente de variação de 3,5%.

O método de HPLC optimizado apresentou repetibilidades e precisão intermédia satisfatórias, com CV%, em geral, inferiores a 5%.

### 3.1.3. Identificação dos picos de gliadinas nas amostras de alimentos estudadas

A identificação de gliadinas nos alimentos em estudo foi realizada por comparação entre os tempos de retenção observados nas amostras e os registados com as soluções padrão de gliadinas, tendo-se ainda confirmado através dos espectros UV registados para cada pico detectado no cromatograma.

Na Figura 7 apresenta-se, a título de exemplo, o perfil cromatográfico obtido por HPLC a 210 nm, para uma solução padrão de gliadinas com concentração de 227 ppm.

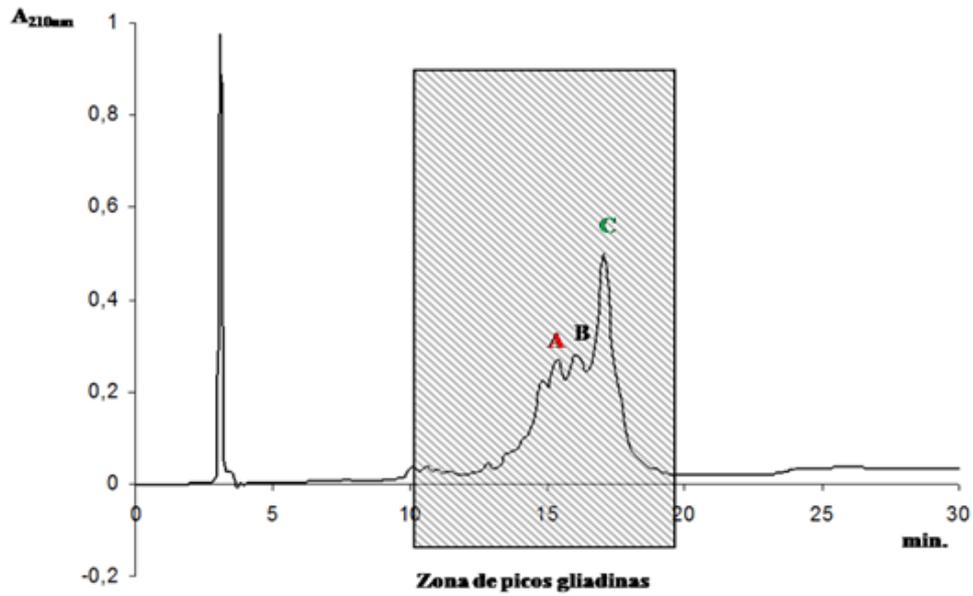


Figura 7. Cromatograma típico das gliadinas

Para picos de maior factor de resposta (A, B e C assinalados na Figura 7) foram registados os respectivos espectros UV (Figura 8), tendo-se constatado serem idênticos, confirmando deste modo tratar-se de gliadinas.

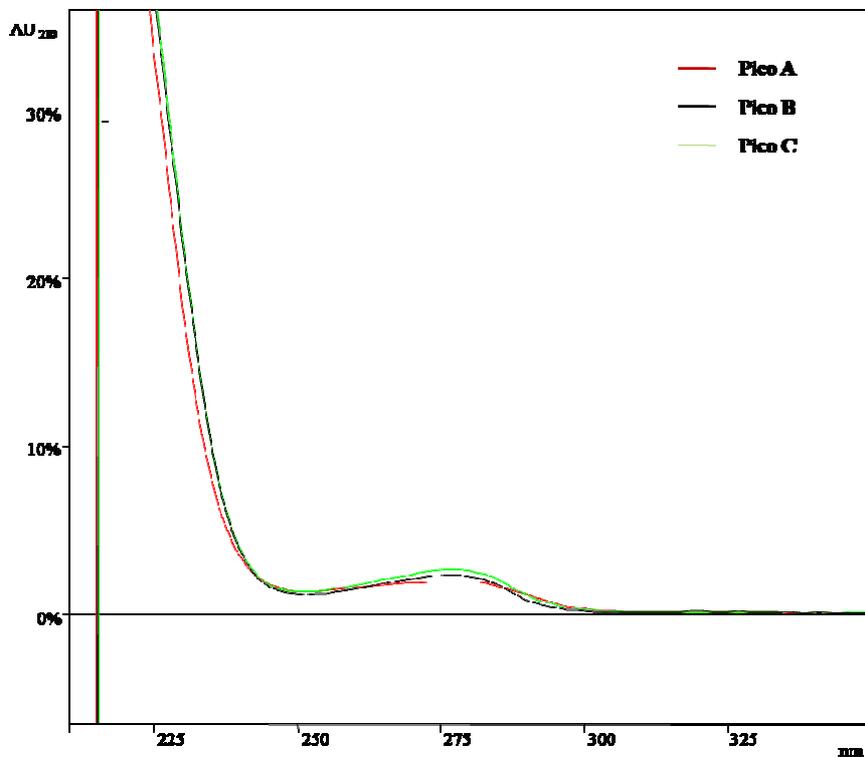


Figura 8. Espectro UV das gliadinas obtido por HPLC

Com base no espectro UV típico para as gliadinas estabelecido a partir da análise das soluções padrão de gliadinas, foi possível identificar os picos dos cromatogramas dos alimentos estudados referentes às gliadinas, permitindo excluir os restantes [82].

Nas Figuras 9 e 10 apresentam-se os perfis cromatográficos registados por HPLC a 210 nm para as amostras alimentares “com” e “sem glúten”, respectivamente.

Relativamente aos alimentos comercializados com a indicação de alimentos “contendo glúten” foi possível, com base na visualização dos perfis cromatográficos obtidos e na análise dos espectros UV para os picos registados na zona de tempos de retenção típicos das gliadinas (10 a 20 minutos), detectar a presença de gliadinas, tal como seria esperado.

Nos alimentos que apresentavam a advertência no rótulo “sem glúten” foram detectadas gliadinas, nomeadamente na farinha 3, pão 2 e papa 3. Nos alimentos farinha 3 e papa 3 identificaram-se gliadinas nos três ensaios realizados e no pão 2 apenas se detectaram gliadinas num dos três ensaios (ensaio 2). Nos alimentos bolacha “Maria” 2, bolacha 2 e cereais de pequeno-almoço 2 com a menção “sem glúten”, não foi possível detectar picos que identificam as gliadinas. Convém, contudo, referir que a detecção de gliadinas em alimentos “sem glúten” é possível, uma vez que atendendo à legislação, alimentos comercializados com a indicação “sem glúten” podem conter até 100 ppm de glúten, o que equivale a cerca de 50 ppm de gliadinas.

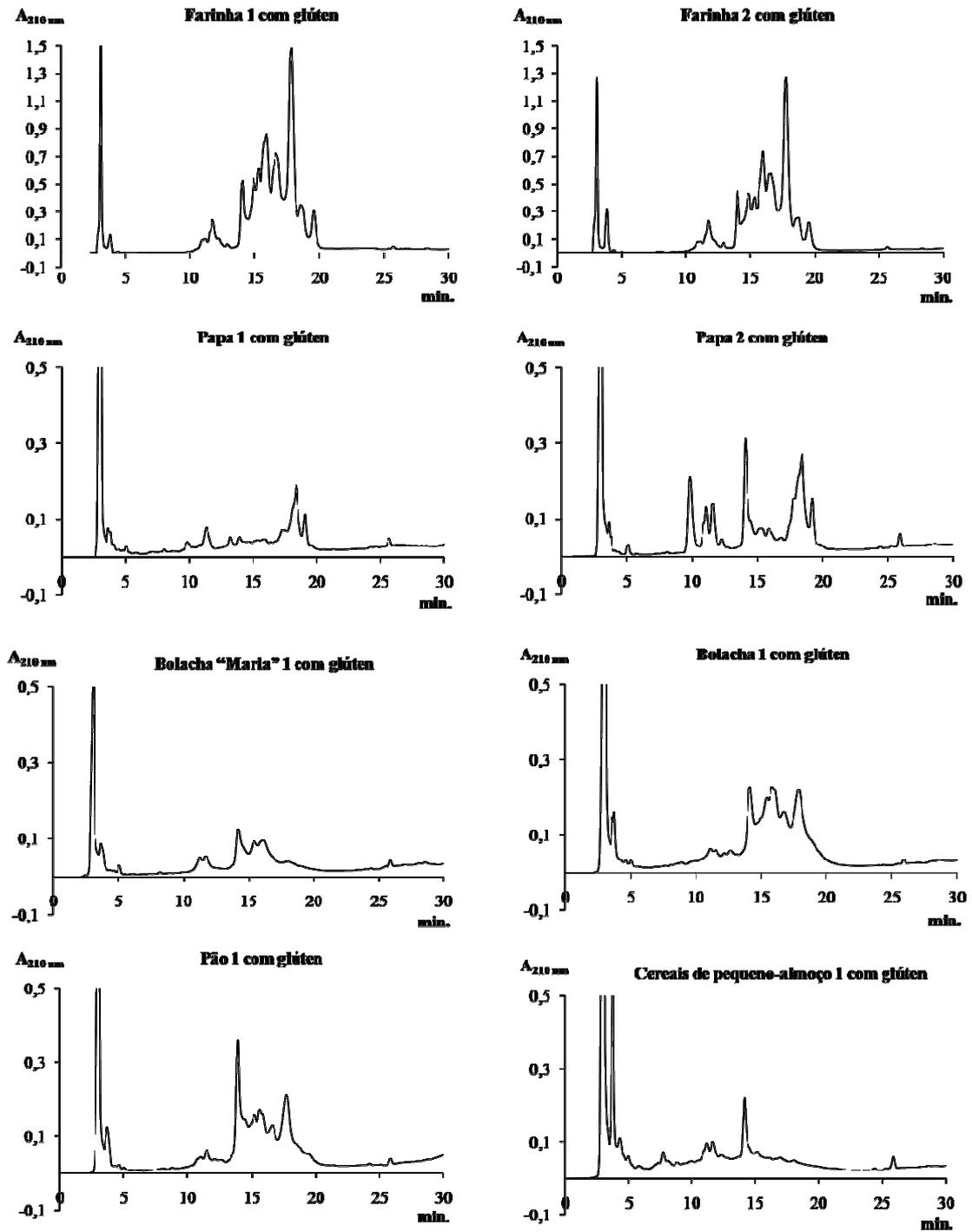


Figura 9. Perfis cromatográficos das amostras alimentares “com glúten” obtidos por HPLC a 210 nm.

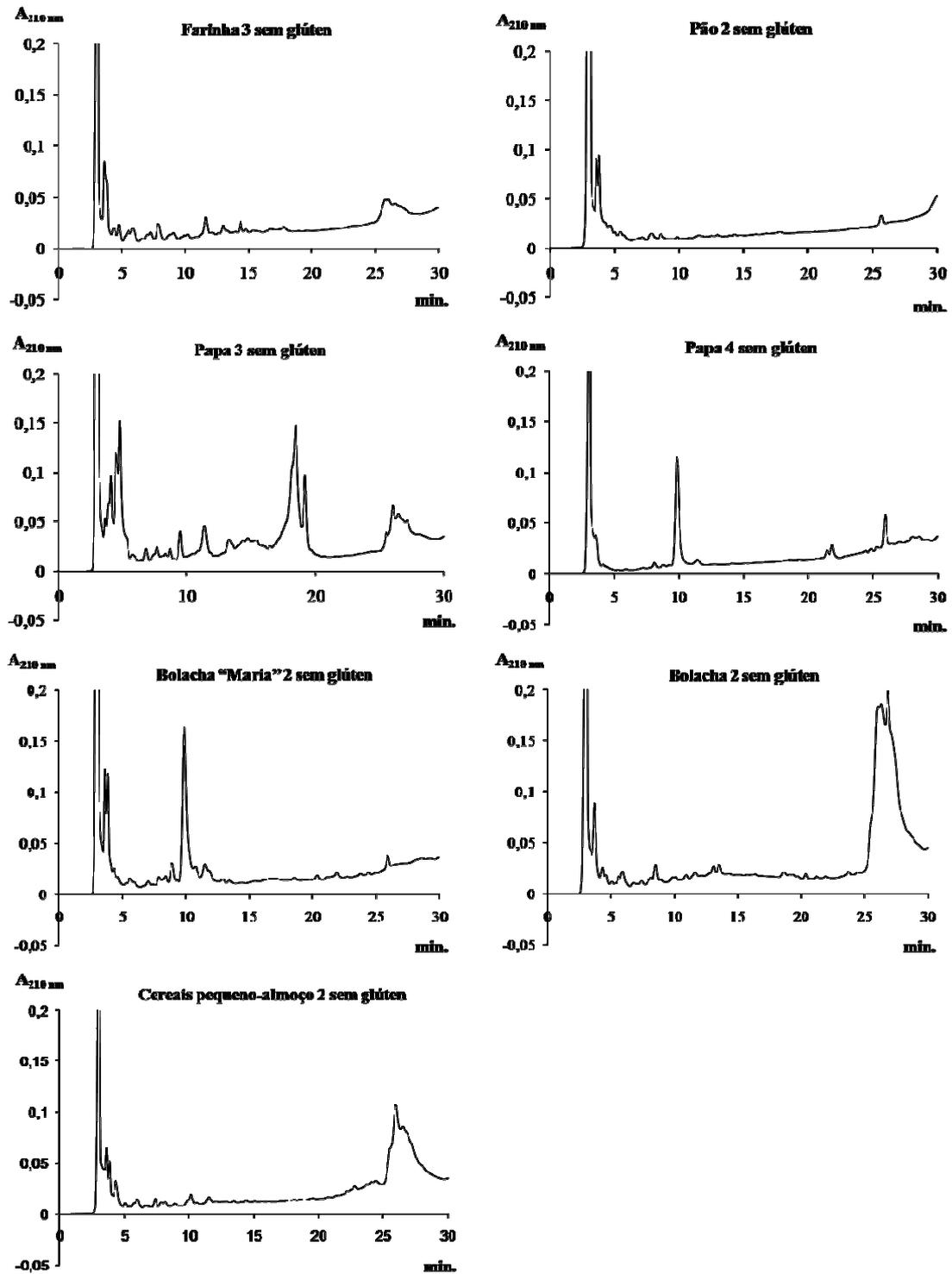


Figura 10. Perfis cromatográficos das amostras alimentares “sem glúten” obtidos por HPLC a 210 nm.

A análise por HPLC das amostras alimentares mostrou ser complexa devido à grande variabilidade de matrizes encontradas nos alimentos, o que resulta na obtenção de extractos etanólicos com diferentes colorações. Por outro lado, não foi possível

determinar com exactidão qual o índice de extracção das gliadinas dos alimentos estudados. De facto, as gliadinas presentes nos alimentos sofreram diversos tratamentos, entre os quais térmicos, o que pode ter levado à sua desnaturação. Assim sendo, a adição de padrão de gliadina às amostras alimentares e sua posterior extracção poderá não ser o indicador mais adequado para determinar a eficiência do processo de extracção utilizado. Contudo, diferentes extracções do mesmo alimento conduziram a perfis cromatográficos idênticos (áreas dos picos semelhantes) indicando que o processo de extracção utilizado é reproduzível.

#### 3.1.4. Quantificação de gliadinas nos alimentos por HPLC

As amostras alimentares foram analisadas por HPLC e a quantificação de gliadinas foi realizada utilizando a recta calibração obtida (secção 3.1.2).

Foi possível detectar gliadinas em todos os alimentos analisados que apresentavam a indicação no rótulo “contém glúten”, mas só foi possível quantificar o teor de gliadinas nos produtos alimentares farinha 1, farinha 2, pão 1, papa 1 e papa 2. Nos alimentos que apresentam a advertência “sem glúten” analisados foi possível quantificar gliadinas numa amostra de papas para crianças, papa 3. Os valores determinados encontram-se apresentados na Tabela 3.

Nos alimentos analisados que apresentam a indicação no rótulo “sem glúten” foi possível quantificar gliadinas numa amostra de papas para crianças (papa 3). Nas amostras pão 2 e farinha 3 “sem glúten” analisadas detectaram-se gliadinas, mas não foi possível quantificar, podendo-se concluir que apresentam um teor de glúten inferior a 20 mg/kg de alimento, o que vai de encontro com a informação apresentada no rótulo e com a legislação em vigor. Nas restantes amostras “sem glúten” não se detectaram gliadinas o que vai de encontro com as informações dos respectivos rótulos. Estes últimos resultados foram confirmados pela comparação do espectro UV registado com o espectro UV típico das gliadinas para cada amostra. A amostra papa 3 apresentou um teor de gliadinas de 930 mg/kg de alimento (com uma variabilidade de resultados analíticos de 11%), o que corresponderá a cerca de 2000 mg de glúten/kg de alimento. Deste modo, o teor em glúten é bastante superior a 100 mg/kg alimento, pelo que de acordo com a legislação em vigor este alimento não deveria apresentar a menção no rótulo “ sem glúten” nem a menção “teor muito baixo de glúten”. Com efeito, a

confirmarem-se estes resultados este alimento não deve ser consumido por pessoas com intolerância ao glúten.

Tabela 3. Concentrações de gliadinas determinadas por HPLC nos extractos e a respectiva concentração de gliadinas por kg de alimento, nos diferentes alimentos analisados “com e sem glúten”.

ALIMENTOS COM INDICAÇÃO NO RÓTULO “COM GLÚTEN”			
Nome	Conc. de gliadinas no extracto (mg/L)*	CV %	Conc. de gliadinas por kg de alimento (mg/kg)*
Farinha 1	760	5	11297
Farinha 2	706	7	10562
Pão 1	624	2	3111
Papa 1	220	1	1090
Papa 2	601	13	2982
Bolacha “Maria” 1	d	–	–
Bolacha 1	d	–	–
Cereais de pequeno-almoço 1	d	–	–
ALIMENTOS COM INDICAÇÃO NO RÓTULO “SEM GLÚTEN”			
Nome	Conc. de gliadinas no extracto (mg/L)*	CV %	Conc. de gliadinas por kg de alimento (mg/kg)*
Farinha 3	d	–	–
Pão 2	nd	–	–
Papa 3	187	11	930
Papa 4	nd	–	–
Bolacha “Maria” 2	nd	–	–
Bolacha 2	nd	–	–
Cereais de pequeno-almoço 2	nd	–	–

\*) nd = não detectado (< 10 mg/L de gliadinas);

d = detectado (10-150 mg/L de gliadinas).

### 3.2. ANÁLISE DOS ALIMENTOS COM O SISTEMA MULTI-SENSOR

Neste trabalho foi ainda investigada a aplicabilidade de um sistema de multi-sensores potenciométricos na diferenciação de alimentos “com glúten” de alimentos “sem glúten”. Uma vez que as respostas deste tipo de sistemas, também designados por língua electrónica, são afectadas pela matriz a analisar (tipo de alimento), foi ainda avaliada a sua capacidade em distinguir diferentes concentrações de gliadinas presentes

---

numa dada matriz alimentar, após adição intencional de quantidades pré-estabelecidas de padrão de gliadinas.

Os perfis dos sinais registados pelo sistema de multi-sensores foram tratados estatisticamente recorrendo à análise discriminante linear, tendo-se estabelecido em cada caso modelos de classificação. Esta técnica estatística multivariada requer, numa fase inicial, o conhecimento *á priori* do grupo a que pertencerá uma dada amostra alimentar, isto é, “com” ou “sem glúten”. Para tal, os alimentos analisados foram classificados atendendo não à informação disponibilizada no rótulo mas sim aos resultados da análise por HPLC. Deste modo, das amostras recolhidas e estudadas, em 6 alimentos foram detectadas e quantificadas gliadinas (concentrações superiores a 900 mg gliadinas/kg de alimento, correspondendo a valores superiores a 1800 mg glúten/kg alimento), em 4 amostras detectou-se mas não foi possível quantificar a concentração de gliadinas (o teor de gliadinas nos extractos analisados variou entre 10 e 150 mg/L de gliadinas, correspondendo a 50-750 mg gliadinas/kg alimento ou seja 100-1500 mg glúten/kg alimento) e em 5 não foram detectadas teores de gliadinas e, por isso, de glúten.

Para todos os modelos de classificação obtidos, verificaram-se os pressupostos da ADL, nomeadamente a normalidade da distribuição das variáveis independentes nos grupos, a homogeneidade de variâncias entre grupos e a igualdade nas matrizes de covariância. Para tal utilizaram-se os testes de Kolmogorov-Smirnov com a correcção de Lilliefors, de Levene e do M-Box, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que, em geral, a um nível de significância de 5%, os modelos estabelecidos cumpriam os referidos pressupostos, excepto o da homogeneidade de covariância. Contudo, o desempenho da ADL é bastante robusto mesmo quando os pressupostos são violados moderadamente e, no caso particular do teste de M-Box, o resultado é particularmente sensível a pequenos desvios à normalidade multivariada [61]. A análise da multicolinearidade foi feita através do cálculo da tolerância de cada variável, que corresponde a uma medida da proporção da variância da variável independente que não é explicada pelas restantes variáveis independentes. Todas as variáveis independentes utilizadas na análise discriminante cumpriam o nível tolerância habitual ( $1-R^2 > 0,6$ ). Mais ainda, as funções discriminantes obtidas por ADL com o procedimento “stepwise”, eram estatisticamente significativas (valor de prova do teste “Wilks’ Lambda” inferior a 5%). O desempenho dos modelos de classificação da ADL foi

avaliado recorrendo à classificação das amostras analisadas nos grupos de dados originais bem como recorrendo à validação cruzada com o “leaving one-out”.

Os sensores (variáveis independentes) que permitiram obter a melhor classificação possível dos alimentos nos grupos pré-estabelecidos foram seleccionados recorrendo ao procedimento “stepwise-backward” (com uma probabilidade do teste F de entrada e saída de 0,15).

Relativamente à classificação dos alimentos estudados em três grupos pré-definidos o procedimento ADL adoptado permitiu seleccionar 14 membranas poliméricas. Os sensores seleccionados foram os seguintes (A1, A2, A3, B1, B2, B3, D4, D5, D6, E1, E2, E3, F1, F5). Estas variáveis respeitam os requisitos do teste de tolerância tendo permitido obter um modelo de classificação com um melhor desempenho comparativamente com um modelo que incluísse as respostas de todas as membranas poliméricas utilizadas no sistema de multi-sensores (36 sensores no total). Foram pré-definidos 3 grupos de alimentos, tendo em conta os resultados obtidos por HPLC. O grupo 1 incluiu os extractos etanólicos de 5 alimentos onde não foram detectadas gliadinas, isto é, com uma concentração de gliadinas inferior a 10 mg/L (correspondendo a uma concentração de gliadinas no alimento inferior a 50 ppm). O grupo 2 incluiu os extractos etanólicos de 4 alimentos onde foram detectadas gliadinas mas não foram quantificadas, ou seja, com concentração de gliadinas compreendidas entre 10 e 150 mg/L (correspondendo a uma concentração de gliadinas entre 50 e 750 ppm no alimento). Por último, o grupo 3 incluiu os extractos etanólicos de 6 alimentos com concentração de gliadinas superior a 150 mg/L (correspondendo a uma concentração de gliadinas superior a 750 ppm no alimento).

O modelo de classificação obtido para diferenciar os 3 grupos de alimentos (“sem”, “baixo teor” e “com gliadinas”, isto é, “com” e “sem glúten”) utiliza duas funções discriminantes que explicam 67,1% e 100% da variabilidade acumulada das variáveis independentes, respectivamente, sendo a primeira função estatisticamente significativa atendendo ao teste Wilk’s Lambda ( $p < 0,001$ ).

Os resultados obtidos associados à discriminação dos alimentos entre os grupos definidos para os dados dos grupos originais assim como para o processo de validação cruzada encontram-se na Tabela 4, bem como, a sensibilidade e especificidade das classificações. No total, foram analisados 45 extractos etanólicos dos 15 alimentos analisados (para cada alimento foram realizadas 3 extracções independentes).

Na figura 11 mostra-se a representação gráfica das 2 primeiras funções discriminantes. Através da análise do gráfico é possível verificar a separação correcta do grupo 2 e que a variabilidade encontrada se deve sobretudo ao grupo 1 e 3.

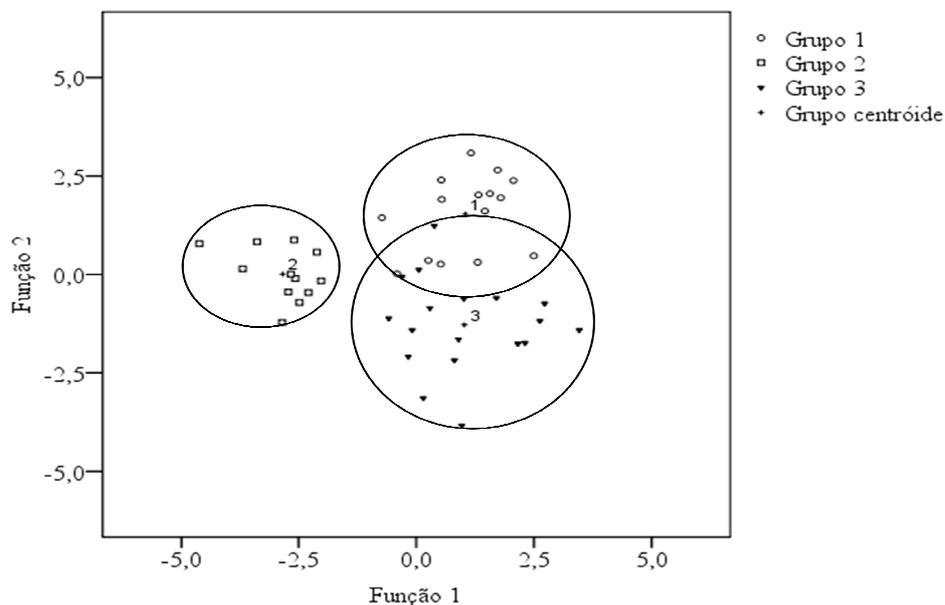


Figura 11. Representação gráfica das 2 primeiras funções discriminantes dos 45 extractos etanólicos.

Tabela 4. Matriz de contingência da análise discriminante de 3 grupos de concentrações de gliadinas extraídas dos 15 alimentos analisados pelo sistema de multi-sensores.

3 GRUPOS COM TODOS OS ALIMENTOS ANALISADOS					
Grupo	1	2	3	Sensibilidade (%)	Sensibilidade total (%)
1	14 (9)	0 (1)	1 (5)	93,3 (60,0)	95,6 (75,6)
2	0 (0)	12 (11)	0 (1)	100,0 (91,7)	
3	1 (3)	0 (1)	17 (14)	94,4 (77,8)	
<b>Especificidade (%)</b>	93,3 (75,0)	100,0 (84,6)	94,4 (70,0)		
<b>Especificidade total (%)</b>	95,9 (76,5)				

Resultados entre parêntesis na tabela são referentes à validação cruzada.

Os valores da sensibilidade e especificidade totais obtidos para os dados originais são 95,6% e de 95,9% e no processo de validação cruzada de 75,6% e de 76,5%, respectivamente, podendo-se concluir que o procedimento apresenta resultados satisfatórios.

Verificou-se também que os, 2 extractos etanólicos de gliadinas de 2 produtos alimentares foram classificados incorrectamente segundo o modelo ADL obtido foram: 1 extracto de pão 1 e 1 extracto da bolacha “Maria” 2. Segundo o procedimento de validação cruzada, verificou-se que 11 extractos etanólicos de 7 produtos alimentares foram classificados incorrectamente segundo o modelo ADL obtido: 3 extractos da bolacha 2, 2 extractos da bolacha “Maria”2, 2 extractos de pão 1, 1 extracto da farinha 3, 1 extracto da farinha 1, 1 extracto da papa 2 e 1 extracto de cereais de pequeno-almoço 2. Verificou-se também que as classificações incorrectas são sobretudo de extractos etanólicos de alimentos transformados pelo calor (bolachas e pão).

A classificação de alguns alimentos no grupo errado, e devido ao facto de em alguns casos essa classificação incorrecta não ter ocorrido em todas as extracções realizadas para o mesmo alimento, pode ser devido à diferença entre os processamentos utilizados na obtenção dos diferentes alimentos analisados (pão, bolachas, cereais, papas e farinhas), aliado ao possível efeito da matriz do tipo de alimento na resposta de cada um dos sensores.

Os resultados obtidos com ADL realizada para os produtos alimentares, permitiu verificar que a matriz dos alimentos influencia a sensibilidade dos sensores e que a variabilidade encontrada se deve essencialmente à diferença nas matrizes dos produtos alimentares estudados. Estas diferenças também são visíveis na coloração dos extractos obtidos (extractos etanólicos de cor “amarelo forte” para os produtos alimentares com tratamento térmico e de aspecto incolor, para os produtos sem tratamento térmico).

Não obstante os resultados satisfatórios obtidos previamente na discriminação entre alimentos “com” e “sem glúten”, procedeu-se ao estudo da sensibilidade do sistema de multi-sensores a diferentes concentrações de gliadinas adicionados a uma amostra de papa “sem glúten” (Papa 4), confirmado por HPLC. Deste modo, pretendeu-se verificar se o efeito de matriz não teria influenciado os resultados anteriormente obtidos na discriminação entre alimentos, permitindo a sua diferenciação não com base nos teores de gliadinas presentes nos extractos etanólicos mas nas diferentes composições desses extractos.

Deste modo, a amostra do produto alimentar “Papa 4 sem glúten” adicionaram-se 5 massas pré-estabelecidas de padrão comercial de gliadinas (ver capítulo Material e métodos, ponto 2.2.4). As massas foram adicionadas de forma a obter misturas etanólicas de cada amostra alimentar com concentrações finais de 10, 20, 50, 100 e 200 ppm em gliadinas (isto é aproximadamente 20, 40, 100, 200 e 400 ppm de glúten

[48,79]), considerando uma extração/dissolução total das gliadinas adicionadas. As quantidades adicionadas foram seleccionadas atendendo aos limites de tolerância ao glúten referidos na legislação. Assim, um alimento com um teor glúten inferior a 20 mg/kg de alimento (inferior a 10 ppm de gliadina) pode ostentar a menção “isento de glúten” e alimentos com um teor de glúten compreendido entre 20 e 100 mg/kg de alimento (10 a 50 ppm de gliadinas) podem ter no rótulo a menção de “teor muito baixo de glúten”.

No total, prepararam-se 10 misturas etanólicas da “Papa 4” sem adição de padrão de gliadinas e 5 misturas etanólicas para cada uma das adições de padrão de gliadinas referidas anteriormente.

Tendo em conta o referido anteriormente, definiram-se 3 grupos consoante a concentração de gliadinas nas misturas etanólicas: grupo zero, para as misturas etanólicas da “Papa 4, sem adição de gliadinas (“sem glúten”); grupo 1, para as misturas etanólicas da “Papa 4” com as concentrações de 10 e 20 ppm gliadinas (ou seja 20 e 40 ppm de glúten), considerados como “baixo teor de glúten”; grupo 2, para as misturas etanólicas “com glúten”, que incluiu as concentrações de 50, 100 e 200 ppm de gliadinas (ou seja 100, 200 e 400 ppm de glúten).

Os sensores seleccionados para efectuar a discriminação entre os grupos de amostras consideradas foram A1, A2, A3, A5, B1, B4, C2, C4, C5, D1, D4, e F1. Os sinais registados por estes sensores, seleccionados através do procedimento “stepwise” da ADL, cumpriram o teste de tolerância e permitiram otimizar o desempenho da classificação modelo.

O modelo de classificação obtido para diferenciar os 3 grupos de alimentos definidos anteriormente utiliza duas funções discriminantes, sendo apenas a primeira função estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ , usando o teste de Wilk’s Lambda). Esta função permitiu contudo explicar, 91,8% da variabilidade existente nos dados.

Na figura 12 mostra-se a representação gráfica das 2 primeiras funções discriminantes. Através da análise do gráfico é possível verificar a separação correcta dos grupos.

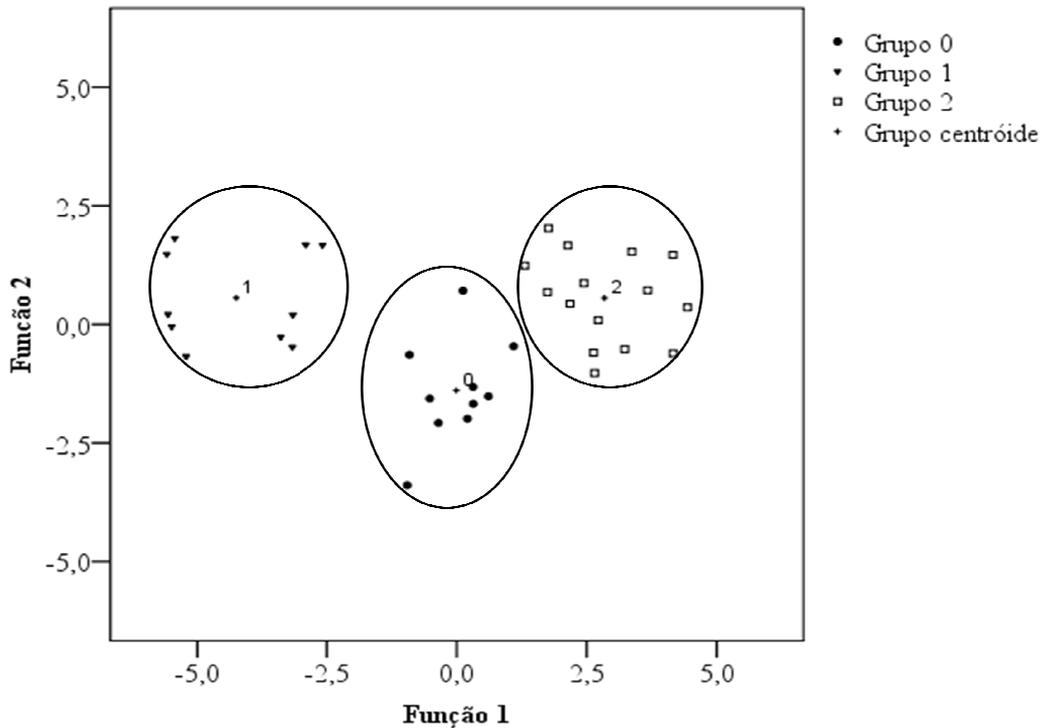


Figura 12. Representação gráfica das 2 primeiras funções discriminantes das 35 misturas etanólicas.

No total, foram analisadas 35 misturas etanólicas (para cada mistura foram realizadas 5 extracções independentes). O modelo ADL obtido permitiu classificar correctamente 100% dos dados originais. Os resultados obtidos para os dados de classificação usando o processo de validação cruzada encontram-se na Tabela 5, assim com os valores de sensibilidade e especificidade. Globalmente a ADL apresentou uma especificidade de 79,8% no procedimento da validação cruzada (previsão).

Tabela 5. Matriz de contingência da análise discriminante, para a validação cruzada, de 3 grupos com diferentes concentrações de gliadinas extraídas da Papa 4 (com e sem adição de padrão de gliadinas).

3 GRUPOS COM DIFERENTES QUANTIDADES DE GLIADINAS PRESENTES NA PAPA 4					
Grupo	1	2	3	Sensibilidade (%)	Sensibilidade total (%)
1	7	1	2	70	80
2	1	9	0	90	
3	3	0	12	80	
<b>Especificidade (%)</b>	63,6	90	85,7		
<b>Especificidade total (%)</b>	79,8				

As misturas etanólicas dos grupos zero, 1 e 2 na validação cruzada, foram classificados correctamente em 70%, 90% e 80%, respectivamente. Verificou-se pela análise dos resultados obtidos da classificação validação cruzada, que das 35 misturas etanólicas analisadas, 7 delas foram classificadas incorrectamente. No grupo zero foram classificados incorrectamente 3 misturas etanólicas, sendo 1 classificado no grupo 1 e 2 no grupo 2. No grupo 1, apenas uma mistura etanólica com a concentração de 20 ppm de gliadina foi classificada incorrectamente no grupo zero. Em relação ao grupo 2, foram mal classificadas 3 misturas etanólicas: 1 mistura com a concentração de 50 ppm de gliadinas, que foi classificado no grupo zero e 2 misturas com a concentração de 100 ppm em gliadinas, que foram classificados no grupo zero. Verificou-se também que as misturas etanólicas com concentrações de 10 ppm em gliadinas (20 ppm de glúten) foram classificadas correctamente no grupo predefinido, podendo-se concluir que o sistema de multi-sensor tem boa sensibilidade nesta concentração.

Com efeito, verifica-se que o sistema de multi-sensores apresenta grande sensibilidade às diferentes concentrações de gliadina presentes nas misturas etanólicas do alimento em estudo (“Papa 4 “sem glúten”), permitindo discriminar os diferentes grupos e prever se um produto alimentar tem teor de glúten compreendido entre 20 - 40 ppm e um teor de glúten compreendido entre 100 - 400 ppm. Estes resultados permitem ainda admitir que a discriminação entre alimentos “com” e “sem glúten” conseguida com o sistema de multi-sensores pode ser atribuída à sensibilidade do sistema a diferentes concentrações de gliadinas e não a efeito de matriz dos diferentes alimentos.

---

**CAPÍTULO 4**  
**CONCLUSÕES**

Garantir que um alimento está livre de glúten é de vital importância para os doentes celíacos, sendo imperativo o desenvolvimento de métodos analíticos robustos e rápidos, para a sua detecção e quantificação.

O objectivo deste trabalho foi estudar a aplicabilidade e sensibilidade de um sistema de multi-sensores na discriminação de alimentos “com” e “sem glúten” através da detecção da presença ou ausência de gliadinas.

O método de HPLC foi utilizado como método de referência para a detecção e quantificação de gliadinas nos diferentes alimentos em estudo. Neste trabalho o método cromatográfico foi otimizado, validado e implementado para a quantificação do teor de gliadinas total. A quantificação do teor de gliadinas presentes nos extractos foi feita através do estabelecimento de uma curva de calibração no intervalo dinâmico de 50 a 1400 ppm, com limites de detecção e quantificação de aproximadamente 10 e 140 ppm. Os picos de gliadinas nos perfis cromatográficos obtidos por HPLC a 210 nm, foram identificados por comparação dos tempos de retenção registados nas amostras analisadas e nos padrões de gliadina. A identificação foi ainda corroborada pela análise dos espectros UV na gama de 190 a 325 nm. A combinação perfil cromatográfico de HPLC/espectros UV revelou ser um bom método de identificação das gliadinas nos produtos alimentares em estudo. Como método de extracção utilizou-se soluções etanólicas a 70%. Apesar desta metodologia não ser a mais adequada para a extracção total de gliadinas de alimentos transformados termicamente, foi seleccionada atendendo à sua simplicidade, baixo custo e ao facto do solvente de extracção (etanol/água) provocar interferências indesejáveis no perfil de sinal do sistema de multi-sensores.

O sistema de multi-sensores utilizado, apresentou desempenho satisfatório na diferenciação de extractos etanólicos com diferentes concentrações de gliadinas, permitindo discriminar alimentos “com” e “sem glúten” com sensibilidades e especificidades globais superiores a 95% nos dados originais e de 75% no processo de validação cruzada.

Permitiu ainda classificar de forma semi-quantitativa um alimento em 3 grupos: alimento sem glúten (<10 ppm, alimento com teor de glúten (20-40 ppm) e alimento com teor de glúten (100-400 ppm). Nesta discriminação obteve-se sensibilidades e especificidades globais de 100% e superiores a 79% para os dados originais e no processo de validação cruzada (previsão), respectivamente.

Os resultados satisfatórios obtidos mostraram que o sistema potenciomérico de multi-sensores desenvolvido com base em membranas lipo-poliméricas pode ser utilizado como uma ferramenta na detecção preliminar de glúten em alimentos. Como trabalho futuro, seria interessante reduzir o número de membranas poliméricas através da optimização da sua composição de forma a melhorar a sensibilidade destas às concentrações de gliadinas.

Futuramente é crucial a normalização de um método de extracção das proteínas do glúten, de forma a facilitar a quantificação do glúten em alimentos “sem glúten”, assim como no desenvolvimento de novos métodos de análise.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] F.M. Anjum, M.R. Khan, D. Ahmad, S. Muhammad, P. Imran, M.U. Arshad, Wheat gluten: High molecular weight glutenin subunits-structure, genetics, and relation to dough elasticity, *Journal of Food Science* 72 (2007) 56-63.
- [2] M.C. Gianibelli, O.R. Larroque, F. Macritchie, C.W. Wrigley, Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits, *Cereal Chemistry* 78 (2001) 635-646.
- [3] I.M. Verbruggen, J.A. Delcour, Extension Properties of Wheat Flour Dough Fortified with Characterized Wheat Gluten Fractions, *Journal of Cereal Science*, 37 (2003) 151-156.
- [4] E. Gallagher, T.R. Gormley, E.K. Arendt, Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products, *Trends in Food Science & Technology* 15 (2004) 143–152.
- [5] H. Wieser, Chemistry of gluten proteins, *Food Microbiology* 24 (2007) 115–119.
- [6] K. Dong, C.Y. Hao, A.L. Wang, M.H. Cai, Y.M. Yan, Characterization of HMW Glutenin Subunits in Bread and Tetraploid Wheats by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Cereal Research Communications* 37 (2009) 65–72.
- [7] F.M. DuPont, V. Samoil, R. Chan, Extraction of up to 95% of Wheat (*Triticum aestivum*) Flour Protein Using Warm Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) without Reduction or Sonication, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 7431-7438.
- [8] P.S.T. Palmu, Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (2003) 244 p.
- [9] S. Ram, N. Jain, V. Dawar, R.P. Singh, J. Shoran, Analyses of Acid-PAGE Gliadin Pattern of Indian Wheats (*Triticum aestivum* L.) Representing Different Environments and Periods, *Crop Science Society of America*, 45 (2005) 1256-1263].
- [10] P.R. Shewry, Y. Popineau, D. Lafiandra, P. Belton, Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science & Technology* 11 (2001) 433-441.

- 
- [11] P.R. Shewry, N.G. Halford, A.S. Tatham, The high molecular weight subunits of wheat glutenin, *Journal of Cereal Science* 15 (1992) 105-120.
- [12] M. Mejri, B. Rogé, A. BenSouissi, F. Michels, M. Mathlouthi, Effects of some additives on wheat gluten solubility: a structural approach, *Food Chemistry* 92 (2005) 7-15.
- [13] J. Leszczynska, A. Łacka, J. Szemraj, J. Lukamowicz, H. Zegota, The effect of microwave treatment on the immunoreactivity of gliadin and wheat flour, *Eur Food Res Technol* 217 (2003) 387–391.
- [14] B. Morón, Á. Cebolla, H. Manyani, M. Álvarez-Maqueda, M. Megías, M.C. Thomas, M.C. López, C. Sousa, Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide, *Am. J. Clin. Nutr.* 87 (2008) 405–14.
- [15] I.D. Hill, M.H. Dirks, G.S. Liptak, R.B. Colletti, A. Fasano, S. Guandalini, Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 40 (2005) 1-19.
- [16] N. Mcgough, J.H. Cummings, Coeliac disease: a diverse clinical syndrome caused by intolerance of wheat, barley and rye, *Proc Nutr Soc* 64(2005) 434-50.
- [17] E.H.A Spaenij-Dekking, E.M.C Kooy-Winkelaar, W.F. Nieuwenhuizen, J.W. Drijfhout, F. Koning, A novel and sensitive method for the detection of T cell stimulatory epitopes of  $\alpha/\beta$ - and  $\gamma$ -gliadin, *Gut* 53 (2004) 1267–1273.
- [18] T. Balkenhohl, F. Lisdat, An impedimetric immunosensor for the detection of autoantibodies directed against gliadin, *Analyst* 132 (2007) 314–322.
- [19] M. Rumbo, F.G. Chirido, C.A. Fossati, M.C. Añón, Analysis of the Effects of Heat Treatment on Gliadin Immunochemical Quantification Using a Panel of Anti-prolamin Antibodies, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5719-5726.
- [20] M.I. Pividori, A. Lermo, A. Bonanni, S. Alegret, M. del Valle, Electrochemical immunosensor for the diagnosis of celiac disease, *Analytical Biochemistry* 388 (2009) 229–234.
- [21] A. Varriale, M. Rossi, M. Staiano, E. Terpetschnig, B. Barbieri, M. Rossi, S. D'Auria, Fluorescence Correlation Spectroscopy Assay for Gliadin in Food, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4687-4689.

- 
- [22] E. Yazynina, M. Johansson, M. Jägerstad, J. Jastrebova, Low folate content in gluten-free cereal products and their main ingredients, *Food Chemistry* 111 (2008) 236–242.
- [23] Decreto-Lei n.º 126/2005 de 5 de Agosto.
- [24] J. Debnath, A. Martin, L.R. Gowda, A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications for gluten-free labelling. *Food Research International* 42 (2009) 782–787.
- [25] L. Olexová, L. Dovičovičová, M. Švec, P. Siekel, T. Kuchta, Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction, *Food Control* 17 (2006) 234–237.
- [26] S. Denery-Papini, Y. Nicolas and Y. Popineau, Efficiency and Limitations of Immunochemical Assays for the Testing of Gluten-free Foods, *Journal of Cereal Science* 30 (1999) 121–131.
- [27] M.C.B. Redondo, P.B. Griffin, M.G. Ransanz, H.J. Ellis, P.J. Ciclitira, C.K. O’Sullivan, Monoclonal antibody-based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins, *Analytica Chimica Acta* 551 (2005) 105–114.
- [28] M. Sandberg, L. Lundberg, M. Ferm, I.M. Yman, Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods, *European Food Research and Technology*, 217 (2003) 344–349.
- [29] D.R Lester, Gluten measurement and its relationship to food toxicity for celiac disease patients, *Plant Methods* 4 (2008) 26–31.
- [30] V. Panteris, D.G. Karamanolis, Gluten enteropathy: current views on diagnosis and treatment, *Annals of Gastroenterology* 18 (2005) 402–419.
- [31] C. Hischenhuber, R. Crevel, B. Jarry, M. Mäki, D.A. Moneret-Vautrin, A. Romano, R. Troncone, R. Ward, Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 23 (2006) 559–575.
- [32] M.L. Sánchez-Martínez, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Homogeneous stopped-flow fluorimmunoassay for gliadin determination in food samples, *Analytica Chimica Acta* 523 (2004) 35–41.
- [33] H.C. van den Broeck, A.H.P. America, M.J.M. Smulders, D. Bosch, R.J. Hamer, L.J.W.J. Gilissen, I.M. van der Meer, A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 975–982.
-

- 
- [34] V.V. Doña, C.A. Fossati, F.G. Chirido, Interference of denaturing and reducing agents on the antigen/antibody interaction. Impact on the performance of quantitative immunoassays in gliadin analysis, *Eur. Food Res. Technol.* 226 (2008) 591–602.
- [35] R. Capparelli, I. Ventimiglia, L. Longobardo, D. Iannelli, Quantification of Gliadin Levels to the Picogram Level by Flow Cytometry, *Cytometry Part A* 63A (2005) 108–113.
- [36] D. Zeltner, M.A. Glomb, D. Maede, Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat, *Eur. Food Res. Technol.* 228 (2009) 321–330.
- [37] D. Sánchez, L. Tučková, M. Burkhard, J. Plicka, T. Mothes, I. Hoffmanov, H. Tlaskalov-Hogenov, Specificity Analysis of Anti-gliadin Mouse Monoclonal Antibodies Used for Detection of Gliadin in Food for Gluten-free Diet, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2627-2632.
- [38] H. Wieser, Investigations on the extractability of gluten proteins from wheat bread in comparison with flour, *Z. Lebensm. Unters Forsch A* 207 (1998) 128–132.
- [39] E.K. Janatuinen, T.A. Kempainen, R.J.K. Julkunen, V-M. Kosma, M. Maki, M. Heikkinen, No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease, *Gut* 50 (2002), 332-335.
- [40] H. William, Toxicidad de las prolaminas del trigo, *Anales Nestlé* 51 (1993), 53-61.
- [41] L. De Stefano, M. Rossi, M. Staiano, G. Mamone, A. Parracino, L. Rotiroti, I. Rendina, M. Rossi, S. D'Auria, Glutamine-Binding Protein from *Escherichia coli* Specifically Binds a Wheat Gliadin Peptide Allowing the Design of a New Porous Silicon-Based Optical Biosensor, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 1241-1245.
- [42] ALINORM 08/31/26, Codex Alimentarius Commission (2008) Report on the 29<sup>th</sup> session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for special dietary uses. 31<sup>th</sup> Session, Geneva, Switzerland.
- [43] L. Sorell, J.A. Loèpez, I. Valdeès, P. Alfonso, E. Camafeita, B. Acevedo, F. Chirido, J. Gaviñondo, E. Meéndez, An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis, *FEBS Letters* 439 (1998) 46-50.
- [44] V.L. Sdepanian, I.C.A. Scaletsky, U. Fagundes-Neto, M.B. de Moraes, Assessment of Gliadin in Supposedly Gluten-Free Foods Prepared and Purchased by Celiac Patients, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 32 (2001) 65–70.

- 
- [45] H.M. Nassef, M.C.B. Redondo, P.J. Ciclitira, H.J. Ellis, A. Fragoso, C.K. O'Sullivan, Electrochemical Immunosensor for Detection of Celiac Disease Toxic Gliadin in Foodstuff, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9265–9271.
- [46] Regulamento (CE) n.º 41/2009 da Comissão de 20 de Janeiro de 2009, Relativo à composição e rotulagem dos géneros alimentícios adequados a pessoas com intolerância ao glúten.
- [47] F. Bela, V.A. M. Daniel, A rede iberoamericana de alimentos para regimes especiais em Portugal. *Rev. de Alimentação Humana*; 1 (2007) 17:20.
- [48] E.S.M. Abdel-Aal, D.A. Salama, P. Hucl, F.W. Sosulski, W. Cao, Electrophoretic Characterization of Spring Spelt Wheat Gliadins, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2117-2123.
- [49] F.M. DuPont, R. Chan, R. Lopez, W.H. Vensel, Sequential Extraction and Quantitative Recovery of Gliadins, Glutenins, and Other Proteins from Small Samples of Wheat Flour, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005), 1575-1584.
- [50] B.X. Fu, H.D. Sapirstein, Procedure for isolation monomeric protein and polymeric glutenin of wheat flour, *Cereal Chem* 73 (1996) 143-152.
- [51] B. Lagrain, B.G. Thewissen, K. Brijs, J.A. Delcour, Impact of Redox Agents on the Extractability of Gluten Proteins during Bread Making, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 5320-5325.
- [52] F. Ronda, J.M. Rodríguez-Nogales, D. Sancho, B. Oliete, M. Gómez, Multivariate optimisation of a capillary electrophoretic method for the separation of glutenins. Application to quantitative analysis of the endosperm storage proteins in wheat, *Food Chemistry* 108 (2008) 287–296.
- [53] V.L. Sdepanian, I.C.A. Scaletsky, M.B. Morais, U. Fagundes-Neto, Pesquisa de gliadinas em medicamentos - informação relevante para a orientação de pacientes com doença celíaca. *Arq. Gastroenterol.* 38 (2001) 176-182.
- [54] M.G Scanlon, H.D. Sapirstein, W. Bushuk, Evaluation of the precision of High-Permanence Liquid Chromatography for wheat cultivar identification, *Cereal Chem.* 62 (1982) 112-116.
- [55] D. Gabrovska, J. Rysova, V. Filova, J. Plicka, P. Cuhra, M. Kubik, S. Barsova, Gluten determination by gliadin enzyme-linked immunosorbent assay kit: Interlaboratory study, *Technology Industry, Journal of AOAC International* 89 (2006) 154-60.

- 
- [56] J.A. Bietz, High Performance Liquid Chromatography: How protein look in cereals, *Cereal Chem.* 62 (1985) 201-212.
- [57]. M. Stern, A major step towards a practical and meaningful gluten analysis, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 17 (2005) 523-524
- [58] P. Ferranti, G. Mamone, G. Picariello, F. Addeo, Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1531–1548.
- [59] M. Stern, P.J. Ciclitira, R. van Eckert, C. Feighery, F.W. Janssen, E. Méndez, T. Mothes, R. Troncone, H. Wieser, Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 13(2001):741-7.
- [60] H. Wieser, Quantitative determination of gliadina subgroups from different wheat cultivars, *J Cereal Sci.* 19 (1994a) 149-55.
- [61] T. Hill, P. Lewicki, *Statistics: Methods and Applications. A Comprehensive Reference for Science, Industry, and Data Mining.* StatSoft, 2006.
- [62] I. Valdez, E. Garcia, M. Llorent, E. Mendez, Innovative approach to low-level glúten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15 (2003) 465-74.
- [63] A.A. Osman, H.H. Uhlig, I.Valdés, M. Mendez, T. Mothes, A monoclonal antibody that recognizes a potential celiac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 13 (2001) 1189-93.
- [64] H. Wieser, Comparative investigations of gluten protein from different wheat species: Qualitative and quantitative composition of gluten protein types, *Eur Food Res Technol* 211 (2000) 262-268.
- [65] J.M. Corres, I.R. Matias, J. Bravo, F.J. Arregui, Tapered optical fiber biosensor for the detection of anti-gliadin antibodies, *Sensors and Actuators B* 135 (2008) 166–171.
- [66] M. Staiano, V. Scognamiglio, G. Mamone, M. Rossi, A. Parracino, M. Rossi, S. D'Auria, Glutamine-Binding Protein from *Escherichia Coli* Specifically Binds a Wheat Gliadin Peptide. 2. Resonance Energy Transfer Studies Suggest a New Sensing Approach for an Easy Detection of Wheat Gliadin, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 2083-2086.
- [67] S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, Aptamers-based assays for diagnostics environmental and food analysis, *Biomol. Eng.* 24 (2007) 191-200.
- [68] J.A. Bietz, T. Burnouf, L.A. Cobb, J.S. Wall, Wheat Varietal Identification and Genetic Analysis by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Cereal Chem.* 61 (1984) 129-135.

- 
- [69] M.G. Scanlon, H.D. Sapirstein, W. Bushuk, Evaluation of the Precision of High-Performance Liquid Chromatography for Wheat Cultivar Identification, *Cereal Chem.* 66 (1989) 112-116.
- [70] A.S. Tatham, S.M. Gilbert, R.J. Fido, P.R. Shewry, Extraction, Separation, and Purification of Wheat Gluten Proteins and Related Proteins of Barley, Rye, and Oats, *Methods in Molecular Medicine*, 41 (2000) 55-73.
- [71] L. Lvova, S.S. Kim, A. Legin, Yu. Vlasov, J.S. Yang, G.S. Cha, H. Nam, All-solid-state electronic tongue and its application for beverage analysis, *Analytica Chimica Acta*, 468 (2002) 303–314.
- [72] P. Ciosek, R. Mamińska, A. Dybko, W. Wróblewski, Potentiometric electronic tongue based on integrated array of microelectrodes, *Sensors and Actuators B* 127 (2007) 8–14.
- [73] L.A. Dias, A.M. Peres, A.C.A. Veloso, F.S. Reis, M. Vilas-Boas, A.A.S.C. Machado, An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk, *Sensors and Actuators B* 136 (2009) 209–217.
- [74] P. Ciosek, W. Wróblewski, The analysis of sensor array data with various pattern recognition techniques, *Sensors and Actuators B* 114 (2006) 85-93.
- [75] L.A. Dias, A.M. Peres, M. Vilas-Boas, M.A. Rocha, L. Estevinho, A.A.S.C. Machado, An electronic tongue for honey classification, *Microchimica Acta* 163 (2008) 97 – 102.
- [76] A. Legin, A. Rudnitskaya, L. Lvova, Yu. Vlasov, C. Di Natale, A. D’Amico, Evaluation of Italian wine by electronic tongue: recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception, *Analytica Chimica Acta* 484 (2003) 33–44.
- [77] Yu. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C.D Natale, A. D’Amico, Nonspecific sensor arrays (“electronic tongue”) for chemical analysis of liquids, *Pure Appl. Chem.* 77 (2005) 1965-1983.
- [78] P. Ciosek, W. Wróblewski, The recognition of beer with flow-through sensor array based on miniaturized solid-state electrodes, *Talanta* 69 (2006) 1156-1161.
- [79] M.C.C. Oliveros, J.L.P. Pavón, C.G. Pinto, M.E.F. Laespada, B.M. Cordero, M. Forina, Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as a fast alternative for the detection of adulteration of virgin olive oils, *Anal. Chim. Acta*, 459 (2002) 219
- [80] M.H. Pestana, J.N. Gageiro, *Análise de dados para Ciências Sociais – A complementariedade do SPSS*, 4ª Ed, 2005, Lisboa: Edições Silabo.

- 
- [81] F. Marini, A.L. Magrì, R. Bucci and A.D. Magrì, Use of different artificial neural networks to resolve binary blends of monocultivar italian olive oils, *Anal. Chim. Acta*, 599 (2007) 232.
- [82] J. Suchy, O.M. Lukow, D. Brown, R. DePauw, S. Fox, G. Humphreys, Rapid assessment of glutenin and gliadina in wheat by UV spectrophotometer, *Crop Science* 47 (2007) 91-99.
- [83] M. Ribani, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, L.F.C. Melo, Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos, *Quim. Nova*, 27 (2004) 771-780.
- [84] DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre validação de métodos em ensaios químicos, Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial, Revisão 01, 2003.
- [85] J. Emer, J.H.M. Miller, *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, ISBN (2005) 3-527-31255-2.

---

## **ANEXOS**

### **ANEXO A – QUANTIFICAÇÃO DOS PADRÕES DE GLIADINA**

INSTRUCTIONS

# Coomassie Plus - The Better Bradford™ Assay Kit

**PIERCE**  
3747 N. Meridian Road  
P.O. Box 117  
Rockford, IL 61105

23236

0229.4

Number	Description
23236	<b>Coomassie Plus - The Better Bradford™ Assay Kit</b> , sufficient reagents for 630 test tube or 3,160 microplate assays <b>Kit Contents:</b> <b>Coomassie Plus - The Better Bradford™ Assay Reagent</b> , 950 ml, containing coomassie G-250 dye, methanol, phosphoric acid and solubilizing agents in water. Store at 4°C. <b>Caution:</b> Phosphoric acid is a corrosive liquid. <b>Albumin Standard Ampules, 2 mg/ml</b> , 10 x 1 ml ampules, containing bovine serum albumin (BSA) at a concentration of 2.0 mg/ml in a solution of 0.9% saline and 0.05% sodium azide. Store unopened ampules at room temperature. (Available separately as Product No. 23209) <b>Storage:</b> Upon receipt store each component as indicated. Product shipped at ambient temperature. <b>Note:</b> Discard any reagent that shows discoloration or evidence of microbial contamination.

## Table of Contents

Introduction .....	1
Preparation of Standards and Assay Reagent .....	2
Test Tube Procedures .....	3
Microplate Procedures .....	3
Troubleshooting .....	4
Related Pierce Products .....	5
Additional Information .....	5
General References .....	6
Product References .....	6

## Introduction

The Coomassie Plus Kit is a quick and ready-to-use coomassie-binding, colorimetric method for total protein quantitation. This modification of the well-known Bradford method greatly reduces the tendency of coomassie reagents to give nonlinear response curves by a formulation that substantially improves linearity for a defined range of protein concentration. In addition, the Coomassie Plus Reagent results in significantly less protein-to-protein variation than is observed with other Bradford-type coomassie formulations.

When coomassie dye binds protein in an acidic medium, an immediate shift in absorption maximum occurs from 465 nm to 595 nm with a concomitant color change from brown to blue. Performing the assay in either test tube or microplate format is simple: Combine a small amount of protein sample with the assay reagent, mix well, incubate briefly and measure the absorbance at 595 nm. Protein concentrations are estimated by reference to absorbances obtained for a series of standard protein dilutions, which are assayed alongside the unknown samples.

**Warranty:** Pierce products are warranted to meet stated product specifications and to conform to label descriptions when used and stored properly. Unless otherwise stated, this warranty is limited to one year from date of sale for products used, handled and stored according to Pierce instructions. Pierce's sole liability for the product is limited to replacement of the product or refund of the purchase price. Pierce products are supplied for laboratory or manufacturing applications only. They are not intended for medicinal, diagnostic or therapeutic use. Pierce products may not be resold, modified for resale or used to manufacture commercial products without prior written approval from Pierce Biotechnology. Pierce strives for 100% customer satisfaction. If you are not satisfied with the performance of a Pierce product, please contact Pierce or your local distributor.

**Preparation of Standards and Assay Reagent**

**A. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards**

Use Table 1 as a guide to prepare a set of protein standards. Dilute the contents of one Albumin Standard (BSA) ampule into several clean vials, preferably in the same diluent as the sample(s). Each 1 ml ampule of Albumin Standard is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range suggested in Table 1. There will be sufficient volume for three replications of each diluted standard.

**Table 1.** Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube and Microplate Protocols (Working Range = 100–1,500 µg/ml)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u>	<u>Volume and Source of BSA</u>	<u>Final BSA Concentration</u>
A	0	300 µl of Stock	2,000 µg/ml
B	125 µl	375 µl of Stock	1,500 µg/ml
C	325 µl	325 µl of Stock	1,000 µg/ml
D	175 µl	175 µl of vial B dilution	750 µg/ml
E	325 µl	325 µl of vial C dilution	500 µg/ml
F	325 µl	325 µl of vial E dilution	250 µg/ml
G	325 µl	325 µl of vial F dilution	125 µg/ml
H	400 µl	100 µl of vial G dilution	25 µg/ml
I	400 µl	0	0 µg/ml = Blank

Dilution Scheme for Micro Test Tube or Microplate Protocols (Working Range = 1–25 µg/ml)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u>	<u>Volume and Source of BSA</u>	<u>Final BSA Concentration</u>
A	3,555 µl	45 µl of Stock	25 µg/ml
B	6,435 µl	65 µl of Stock	20 µg/ml
C	3,970 µl	30 µl of Stock	15 µg/ml
D	3,000 µl	3,000 µl of vial B dilution	10 µg/ml
E	2,500 µl	2,500 µl of vial D dilution	5 µg/ml
F	1,700 µl	1,700 µl of vial E dilution	2.5 µg/ml
G	4,000 µl	0	0 µg/ml = Blank

**Microplate Procedures**

**A. Standard Microplate Protocol (Working Range = 100–1,500 µg/ml)**

1. Pipette 10 µl of each standard or unknown sample into the appropriate microplate wells.
2. Add 300 µl of the Coomassie Plus Reagent to each well and mix with plate shaker for 30 seconds.
3. Remove plate from shaker. For the most consistent results, incubate plate for 10 minutes at room temperature (RT).
4. Measure the absorbance at or near 595 nm with a plate reader.
5. Subtract the average 595 nm measurement for the Blank replicates from the 595 nm measurements of all other individual standard and unknown sample replicates.
6. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 595 nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in µg/ml. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

**Note:** When compared to the Standard Test Tube Protocol, 595 nm measurements obtained with the Microplate Protocols are lower because the light path is shorter. Consequently, this may increase the minimum detection level of the assay. If higher 595 nm measurements are required, use 15 µl of standard or sample and 300 µl of Coomassie Plus Reagent per well.

**Note:** If using curve-fitting algorithms associated with a microplate reader, a four-parameter (quadratic) or best-fit curve will provide more accurate results than a purely linear fit. If plotting results by hand, a point-to-point curve is preferable to a linear fit to the standard points.