

Métodos analíticos para detecção de glúten em alimentos

Analytical methods for detecting gluten in foods

RIALA6/1111

Sônia França Correia BARBOSA*¹, Rejane Weissheimer de ABREU², Odair ZENEON²

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Imunologia, Av. Dr. Arnaldo, 351, 11º andar, Cerqueira Cesar CEP 01246-902 São Paulo/SP e-mail: sbarbosa@ial.sp.gov.br.

²Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.

Recebido: 05/01/2007 – Aceito para publicação: 29/06/2007

RESUMO

O tratamento para a doença celíaca (DC) consiste em dieta livre das prolaminas: gliadina, hordeína, secalina e avenina existentes no trigo, centeio, cevada e aveia. A Comissão do *Codex Alimentarius* (FAO/WHO) definiu o limite de 200 ppm (mg/kg) de glúten para o alimento ser considerado livre desse produto. A revisão de 2004 do *Codex Alimentarius* sugeriu o limite de 20 ppm para produtos naturalmente sem glúten e de 200 ppm para produtos derivados de ingredientes não fonte de glúten, porém esses limites estão ainda em discussão. Entre os métodos analíticos para detectar ou determinar glúten/gliadina têm sido empregadas as técnicas de: espectrometria de massa, cromatografia líquida, análise de DNA do trigo e imunoenzimáticos. O método oficial adotado pela *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) é o ELISA baseado no anticorpo monoclonal para ω gliadina. O *Codex Alimentarius* endossou temporariamente, o R5 ELISA como Método Tipo I. O R5 ELISA utiliza anticorpo monoclonal para o pentapeptídeo tóxico existente na gliadina, hordeína e secalina. O ELISA, em função de sua maior sensibilidade e apropriado limite de detecção (1,5 ppm de gliadina), é considerado superior às demais técnicas. A presença de pequenos fragmentos de proteína existentes em prolaminas hidrolisadas devem ser avaliados por métodos baseados em DNA.

Palavras chave. doença celíaca, gliadina, glúten, epítomos tóxicos, ELISA.

ABSTRACT

Treatment of celiac disease (CD) is consisted of a diet free of prolamins as gliadin, hordein, secalin, and avenin existing in wheat, barley, rye, and oats. The *Codex Alimentarius Commission* (FAO/WHO) has defined the maximum gluten content of 200 ppm (mg/kg) to consider as gluten-free products. The *Codex Commission* Review 2004 recommended the limits of 20 mg/kg dry mass for naturally gluten-free products, and 200 mg/kg for food derived from gluten-free products. Among analytical methods for detecting or determining glúten/gliadin the following techniques have been used: mass spectrometry, high performance-liquid chromatography, wheat DNA analysis by PCR, and immunoenzyme assay. ELISA based on monoclonal antibody for ω gliadin has been the technique officially recommended by the *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC). R5-ELISA has got a provisory approval from the *Codex Alimentarius* as type I method. R5-ELISA is based on the use of a monoclonal antibody for pentapeptide occurring in gliadin, hordein, secalin, and avenin, and this assay presents sensitivity and limit detection (1.5 ppm gliadin) rates superior in comparison to other techniques. Although, the qualitative analysis for detecting the presence of small fragment of protein in hydrolized prolamine should be assessed by means of DNA-based techniques.

Key-words. celiac disease, gliadin, gluten toxic epitope, ELISA

INTRODUÇÃO

A doença celíaca (DC) é uma patologia caracterizada pela intolerância permanente as prolaminas existentes no trigo, centeio, cevada ou aveia, resultando em atrofia total ou subtotal do intestino delgado proximal ocasionando má absorção dos nutrientes¹. A interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais explica a heterogeneidade da doença. A DC está associada aos genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e, em particular, ao HLA-DQ2 ou HLA-DQ8, mas outros genes, HLA e não HLA, também estão relacionados no desenvolvimento da doença. A lesão intestinal é mediada por componentes humorais e celulares da resposta imunológica². O tratamento existente é uma dieta livre de prolaminas³ existentes no trigo, centeio, cevada e aveia. Estudos populacionais indicam que 0,5% e 1% da população do Oeste Europeu⁴ e da América do Norte⁵, respectivamente, sofrem de DC, correspondendo em torno de três a seis milhões de pessoas. No Brasil, Patresi et al⁶, em Brasília, estudaram um grupo de 4405 pacientes sem suspeita clínica prévia, observando a prevalência de 1/169 em crianças e 1/474 em adultos com a forma atípica da DC. Este estudo mostra que a DC não é rara no Brasil e na maioria dos casos está sendo subdiagnosticada. O objetivo deste trabalho foi o de revisar os conceitos epidemiológicos, a expressão clínica da doença celíaca e sua prevenção através de alimento livre de glúten assegurado por métodos analíticos.

Química das proteínas do glúten

As proteínas do glúten representam 80% das proteínas totais dos grãos formada por um complexo de proteínas-lipídio-carboidrato com a seguinte composição proteína (75%); carboidrato (15%); lipídio (6%) e minerais (0,8%).

As proteínas dos cereais podem ser divididas em quatro classes segundo a sua solubilidade⁷ (1) albuminas solúveis em água, (2) globulinas solúveis em soluções salinas, (3) prolaminas solúveis em soluções de álcoois a 70 e 90% e glutelinas solúveis em soluções ácidas ou alcalinas. As prolaminas e glutelinas constituem 80 a 90% do total das proteínas do trigo, centeio, cevada, enquanto que as albuminas e globulinas contribuem com 20% ou menos. Na aveia as globulinas são predominantes, representando aproximadamente 56% da proteína de reserva. As prolaminas são denominadas de gliadina no trigo, hordeína na cevada, secalina no centeio e avenina na aveia enquanto para as glutelinas, tem-se a glutelina no trigo, a hordenina na cevada⁸.

Quanto ao peso molecular as gluteninas possuem alto peso molecular (APM), as gliadinas ω 1,2 médio peso molecular (MPM), as gliadinas α , γ e subunidades de glutenina baixo peso molecular (BPM). Gliadinas são monômeros de proteínas classificadas em α , β , γ e ω conforme sua mobilidade eletroforética. A diferença entre as duas primeiras é pequena, sendo designadas de α/β . As gliadinas α , β , γ têm estrutura compacta, são ricas em enxofre e não são estáveis ao tratamento térmico. As ω gliadinas podem ser subdivididas, de acordo com

a sua composição de aminoácidos e seqüência de N terminais, em dois formatos: $\omega 5$ e $\omega 1,2$. A fração das ω gliadinas não contém cisteína e, portanto, não estão envolvidas na troca de dissulfeto, sendo por esta razão termoestável. As α e γ gliadinas possuem unidades repetitivas do formato α , formada pelos peptídeos glutamina-prolamina-glutamina-prolina-prolina prolina glutamina glutamina fenilalanina-prolina-tirosina-fenilalanina (G.P.G.P.P.P.G.G.Fen.P.Tir.Fen) que são repetidos por cinco vezes. A unidade típica do formato γ é P.G.G.P.Fen.P.G., repetida por 16 vezes e interespaçada por G.G.G.Tir.G.G, L.G.G ou P.G.G. Os diferentes grupos de proteínas são homólogos em duas das cinco regiões e são tipicamente diferentes nos N terminais e seqüências repetidas³.

As gluteninas são agregados de proteínas ligadas intermolecularmente por pontes de dissulfeto, podendo originar um amplo espectro de pesos moleculares, atingindo a ordem de milhões. Após redução das pontes de dissulfeto, as subunidades de glutenina mostram solubilidade similar à das gliadinas. Com base na estrutura primária, as gluteninas podem ser divididas em subunidades de APM, incluindo os formatos x e y, e subunidades de BPM⁹.

A importância do glúten na tecnologia de panificação se prende às propriedades de coesividade-elasticidade da massa obtida a partir da farinha e de outros ingredientes incorporados à farinha⁸.

O aspecto estrutural destas proteínas reflete a relação taxonômica entre os cereais. Desta maneira, nas *Triticeae* (trigo, centeio e aveia) estão presentes os três tipos de grupos de proteínas de alto, médio e baixo peso molecular. As prolaminas das aveias (aveninas) podem ser classificadas como pertencentes ao grupo BPM. As proteínas do arroz, milho e sorgo não possuem relação com as *Triticeae*³.

Relação entre a estrutura química e toxicidade celíaca

As prolaminas tóxicas para celíacos são gliadina, secalina, hordeína e a avenina. Ensaio *in-vitro* (em cultura de células de intestino delgado) demonstraram que todos os tipos de gliadinas (α , β e ω) produzem efeitos tóxicos. A gliadina e fragmentos formados por digestão péptica estimulam monócitos e aumentam interleucina 8 e a produção de interferon α^9 . As subunidades de glutenina de alto peso molecular estimulam células do intestino delgado de celíacos e produzem aumento de interleucina 5 após 2 horas ao desafio¹⁰. Alguns indivíduos com doença celíaca podem ser sensíveis às proteínas existentes na aveia¹¹⁻¹³. Estudos têm demonstrado que a maioria dos indivíduos com doença celíaca pode tolerar um limite diário de 50 g de aveia¹⁴. A controvérsia sobre a sua toxicidade pode ser explicada pela presença de trigo, centeio e/ou cevada na maioria dos alimentos com farinhas de aveia comercializadas na Europa, EUA e Canadá¹⁵.

Limites clínicos de tolerância ao glúten

A contaminação do glúten em produtos livres de glúten deve ser evitada. Para minimizar tais riscos na produção,

recomenda-se a adesão às diretrizes de “Boas Práticas de Fabricação” referentes à fabricação, rotulagem e informação aos consumidores¹⁶. A dificuldade em se estabelecer os limites aceitáveis de traços de glúten em amostras livres de glúten é devido à toxicidade e imunogenicidade das prolaminas não serem idênticas em todos os pacientes celíacos³.

Estudo de micro desafio, formato duplo-cego, utilizando placebo e grupo controle selecionado ao acaso foi realizado em 49 adultos com biópsia comprovada de doença celíaca, tratados com dieta livre de glúten por tempo maior ou igual há dois anos. Não foram observadas mudanças clínicas e sorológicas nestes pacientes quando submetidos à exposição de 10 a 50 mg de glúten ao dia por três meses. As biopsias dos pacientes que ingeriram 50 mg por dia de glúten apresentaram, aumento de linfócitos intraepiteliais, e ligeira hiperplasia das criptas intestinais¹⁷. O significado estatístico destes valores não pode ser considerado devido ao pequeno número de participantes por grupo estudado, e a baixa hiperplasia observada com relação ao início dos testes de desafio dos participantes. A informação dos limites de tolerância ao glúten dos pacientes com DC é crucial para a legislação dos alimentos livres de glúten e deve ser estabelecida por estudos aleatórios com número significativo de pacientes para ser conclusiva¹⁸⁻²⁰. O alimento livre de glúten para ser consumido pelo celíaco deve obedecer os limites estabelecidos pelo Comissão do *Codex Alimentarius* não sendo necessária a sua total ausência no produto analisado.

Alimentos livres de glúten

O *Codex Alimentarius Committee on Nutrition e Food for Special Dietary* adotaram o primeiro padrão de alimento livre de glúten em 1981 (*Codex Stan 118-1981*)²¹ avaliado em 0,05 g de nitrogênio por 100g de produto seco (referente ao amido do trigo). Na última revisão do *Codex Alimentarius*, foi proposto o limite de 20 ppm para alimentos naturalmente sem glúten e 200 ppm de glúten para misturas de ingredientes derivadas com não contêm glúten²². Estes valores estão apoiados na dose de glúten tolerada pelos pacientes celíacos e na análise dos alimentos livres de glúten. Estes parâmetros estão em discussão devido aos estudos terem sido realizados com pequeno número de pacientes e os alimentos livres de glúten analisados pelo ELISA que utiliza anticorpo monoclonal para ω gliadina com sensibilidade e especificidade menor do que o R5 ELISA. A revisão dos limites (*Codex document ALINORN 07/30/26 APPENDIX IV*) estabelece um novo limite de 20mg/kg para produto constituído por alimento naturalmente livre de glúten e uma quantidade não superior a 100mg/kg na mistura de dois ingredientes naturalmente livres de glúten e no alimento processado derivado de ingredientes não fontes de glúten²³.

Regulamentação

No Brasil a lei 10.674/2003²⁴ obriga as inscrições “CONTÊM GLÚTEN ou NÃO CONTÊM GLÚTEN” nos rótulos dos produtos alimentícios e farmacêuticos, comercializados, como medida preventiva e de controle da

doença celíaca. A Lei até o momento não foi regulamentada devido a não definição de padrões para um alimento ser considerado livre de glúten.

MÉTODOS DE ANÁLISE DE GLÚTEN

As gliadinas podem ser detectadas por espectrometria de massa²⁵, cromatografia líquida de alta resolução²⁶, análise de DNA^{27,28}, e métodos imunológicos²⁹⁻³⁶. A espectrometria de massa é utilizada para triagem, enquanto a cromatografia líquida de alta resolução é altamente específica, uma vez que as prolaminas dos cereais são conhecidas. Entretanto, este método tem sensibilidade e especificidade mais baixa do que os imunológicos, possuem custo mais elevado maior tempo de execução, e com frequência apresentam resultados não confiáveis quando o alimento for processado ou aquecido. O emprego do método de PCR pode ser utilizado na detecção do DNA do trigo para confirmar a análise de alimentos onde o método de ELISA não for conclusivo. As técnicas imunológicas adotadas na detecção de glúten são ELISA^{29,30}, *Western blotting*³¹, e *dot blotting*³². Os métodos para a análise de glúten confrontam-se com diferentes problemas, tais como natureza heterogênea dos alimentos, composição variável do glúten e dificuldade de quantificar produtos processados aquecidos ou quando o glúten estiver parcialmente hidrolisado.

Padrão de gliadina

A seleção de um padrão de gliadina adequado é crucial para a determinação de glúten em amostras de alimentos. Durante a extração de gliadinas com etanol a presença de proteínas de alto e médio peso molecular pode superestimar os resultados do ELISA. O padrão de gliadina (Sigma) pode ser estocado em solução alcoólica a 60% ou liofilizado. Alíquotas de 250 μ L em solução alcoólica a 60% numa concentração de 500 μ g/mL são estáveis pelo menos por 10 μ g meses à temperatura ambiente³⁰. Um novo padrão de gliadina foi produzido a partir de 28 diferentes variedades de trigo mais frequentes na Inglaterra, França e Alemanha³³. O padrão possui alto conteúdo de proteína, boa solubilidade, estabilidade e sensibilidade frente a diferentes anticorpos para gliadinas em ensaios de ELISA. O padrão está para ser certificado como IRMM-480 pela Comissão Européia³⁴ do (Institute Reference Materials and Measurements Geel, Bélgica).

Processos de extração

A solução de 40 a 70 % de etanol pode ser empregada para a extração em alimentos de ω gliadinas estáveis ao calor e pequenas quantidades de α , β e γ gliadinas. A maioria das α , β e γ gliadinas somente é extraída por redução e com o uso de agentes desagregantes. Observam-se diferenças de resultados quando se compara a solução coquetel contendo 250 mm de 2-mercaptoetanol e 2M de cloridrato de guanidina revelando alta eficiência na detecção de gliadina em produtos aquecidos.

O coquetel pode ser usado como processo geral em todos os métodos para aumentar o desempenho da análise de gliadina em alimentos³⁵.

Métodos utilizando anticorpos policlonais

Friis, em 1981³⁶, desenvolveu o método de ELISA competitivo utilizando anticorpos policlonais para prolaminas. O limite de detecção foi de 1ng de antígeno, mas somente podia ser aplicado em alimentos não processados. Troncone et al³⁷ utilizaram o ELISA formato sanduíche com anticorpos IgG de coelho específicos para gliadina. O ensaio exibiu alta sensibilidade, mas houve reação cruzada com prolaminas do arroz e milho. Fredman et al.³⁸ analisaram produtos sem glúten empregando ELISA formato sanduíche utilizando anticorpo policlonal para gliadina como para captura e um segundo anticorpo monoclonal para gliadina. O limite de detecção foi 15ng. O ensaio detectou todos os tipos de prolaminas tóxicas aos celíacos, não se evidenciando as proteínas não tóxicas do arroz e milho. Chirido et al.³⁹ desenvolveram o ELISA competitivo usando anticorpo policlonal com alto grau de detectabilidade, e discriminaram as prolaminas não tóxicas para celíacos. Anticorpos policlonais reagem com diferentes epítomos e, como consequência, os resultados são menos dependentes da cultura de trigo⁴⁰. A desvantagem é que o efeito desnaturante do processo de aquecimento das amostras alimentícias faz com que algumas frações de gliadina sejam pouco extraídas e, desta maneira, os epítomos não estão disponíveis para reagir com o anticorpo, influenciando fortemente o resultado⁴¹.

ELISA com anticorpo monoclonal

O método oficialmente aceito pela *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) utiliza anticorpo monoclonal para ω gliadinas, que são estáveis ao calor³. O limite de detecção é de 16mg/100 g de gliadina, possui baixa sensibilidade para aveia e cevada e não detecta as prolaminas do arroz e milho. Existe um risco de serem estimados valores acima ou abaixo do total de gliadina devido à concentração das ω gliadinas variar de 6% a 20% em função da variedade do trigo⁴². O R5 ELISA utiliza anticorpo monoclonal dirigido contra o pentaptídeo tóxico G.G.P.F.P. existente nas α , γ e ω gliadinas, existente em diferentes variedades de trigo, centeio, cevada e gluteninas de baixo peso molecular⁴³. Não é cultivo dependente, é compatível com a solução de extração coquetel, sendo hábil para detectar produtos aquecidos ou não. O anticorpo não reage com as prolaminas do milho, arroz e aveia. O ensaio utiliza gliadina padrão (IRM-480) e detecta glúten em alimentos contendo transglutaminase utilizada para o enriquecimento da farinha. O conteúdo de glúten no alimento é calculado levando-se em conta a estimativa de que 50% do glúten está sob a forma de gliadina³⁰. Estudo colaborativo realizado com dois kits comerciais R5 ELISA, foram comparados. Os resultados demonstraram que a repetitividade e a reprodutibilidade dos dois kits foram aceitáveis para o teste de ELISA e garantiram uma sensibilidade 1,5 ppm de gliadina

em alimento livre de glúten⁴⁴. O R5 ELISA pode ser empregado na triagem de prolaminas hidrolisadas da cevada e do trigo (como maltodextrinas, prolaminas no malte e cerveja etc) provenientes da proteólise ocorrida durante o processamento do alimento, sendo que os resultados podem ser confirmados por *Wethern blot*⁴⁵.

CONCLUSÃO

Assegurar que um alimento é livre de glúten é de vital importância para o doente celíaco sendo imperativa a necessidade de métodos analíticos confiáveis para atender a legislação. Novos estudos devem ser realizados para se estabelecer a quantidade de glúten tolerada pelos celíacos. O R5 ELISA foi endossado, provisoriamente pelo *Codex Alimentarius* como Método Tipo I para a análise de glúten após sua avaliação por ensaios colaborativos. O R5 ELISA possui limitações preocupantes devido ao padrão de gliadina não ter sido aceito internacionalmente e o anticorpo não reconhecer subunidades de alto peso molecular de glutenina conhecida por ser tóxica em pacientes celíacos. Outros métodos deverão ser desenvolvidos utilizando o anticorpo monoclonal para pentaptídeo tóxico, proporcionando melhores resultados do que do que o método R5 ELISA para a análise de glúten. Por outro lado, a análise qualitativa indicando fragmentos de proteína de glúten deve ser baseada em métodos de DNA.

REFERÊNCIAS

1. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet*. 1994; 343(8891):200-3.
2. Utiyama SR, Reason IJ, Kotze LM. Genetics and immunopathogenesis aspects of the celiac disease: a recent vision. *Arq Gastroenterol*. 2004; 41(2): 121-8.
3. Stern M, Ciclitira PJ, van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Méndez, et al. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 13(6):741-7.
4. Rostami K, Mulder CJ, Werre JM, van Beukelen FR, Kerchhaert J, Crusius JB, et al. High prevalence of celiac disease in apparently healthy blood donors suggests a high prevalence of undiagnosed celiac disease in the Dutch population. *Scand J Gastroenterol*. 1999; 34(3): 276-9.
5. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med*. 2003; 163(3): 286-92.
6. Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, Modelli IC, Lopes de Almeida P, Bocca AL, et al. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scand J Gastroenterol*. 2003; 38(7): 747-50.

7. Osborne, TB. The vegetable proteins 2nd London: Longmans Green and Company 1924.
8. Sgarbieri, VC. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações/Valdemiro C.Sgarbieri.-São Paulo: Livraria Varela, 1996.
9. Dewar DH, Amato M, Ellis HJ, Pollock EL, Gonzalez-Cinca N, Wieser H, Ciclitira PJ. The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 18(5):483-91.
10. Shidrawi RG, Day P, Przemioslo R, Ellis HJ, Nelufer JM, Ciclitira PJ. In vitro toxicity of gluten peptides in coeliac disease assessed by organ culture. *Scand J Gastroenterol*. 1995; 30(8):758-63.
11. Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Scott H, Koning F, Jung G, et al. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med*. 2004; 1(1):e1. Epub 2004.
12. Lundin KE, Nilsen EM, Scott HG, Loberg EM, Gjoen A, Bratlie J, et al. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut*. 2003; 52(11):1649-52.
13. Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJ, Kosma VM, Maki M, Heikkinen M, et al. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut*. 2002; 50(3):332-5.
14. Størsrud S, Olsson M, Arvidsson Lenner R, Nilsson LA, Nilsson O, Kilander A. Adult coeliac patients do tolerate large amounts of oats. *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57(11): 163-9.
15. Størsrud S, Malmhen YI, Lenner RA. Gluten contamination in oats and products naturally free from gluten. *Eur Food Res Technol*. 2003; 217(6):481-5.
16. Huggett AC, Hischennhuber C. Food manufacturing initiatives to protect the allergic consumer. *Allergy*. 1998; 53(46 Suppl):89-92.
17. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85(1):160-6.
18. Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, Maki M, Moneret-Vautrin DA, Romano A, et al. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 23(5):559-75.
19. Gibert A, Espadaler M, Angel Canela M, Sanchez A, Vaque C, Rafecas M. Consumption of gluten-free products: should the threshold value for trace amounts of gluten be at 20, 100 or 200 p.p.m.? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 18(11):1187-95.
20. Collin P, Thorell L, Kaukinen K, Maki M. The safe for gluten contamination in gluten-free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of coeliac disease? *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 19(12):1277-83.
21. *Codex Alimentarius Commission. Codex Standard for 'gluten-free food' (Codex Stan 118-1981, Amended 1983)*. Rome, Italy: FAO/WHO, p 1983.21.
22. *Codex Alimentarius Draft revised standard for gluten free foods. Codex Alimentarius ALINORN 04/27/26, 2004 Appendix III, Rome, pp., 43-45.*
23. Report of the 28th session of the *Codex Committee on Nutrition and for Special Dietary Uses*, 30 October-3 November, Chiang Mai, Thailand ALINORM 07/30/26-Rev APP. IV.
24. BRASIL. Lei n. 10.674 de 16 de maio de 2003. Obriga a que todos os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. *Diário Oficial da União, Brasília, (2003 maio); Séc.1. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br.> Acesso em: 22 de junho 2007.*
25. Hernando A, Valdes I, Mendez E. New strategy for the determination of gliadins in maize- or rice-based foods matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: fractionation of gliadins from maize or rice prolamins by acidic treatment. *J Mass Spectrom*. 2003; 38(8): 862-71.
26. DuPont FM, Chan R, Lopez R, Vensel WH. Sequential extraction and quantitative recovery of gliadins, glutenins, and other proteins from small samples of wheat flour. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(5):1575-84.
27. Henterich N, Osman AA, Méndez E, Mothes T. Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. *Nahrung*. 2003; 7(5):345-8.
28. Allmann M, Candrian U, Hofelein C, Luthy J. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1993; 196(3):248-51.
29. Skerritt JH, Hill AS. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*. 1991; 74(2):257-64.
30. Valdés I, Garcia E, Llorente M, Mendez E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003; 15(7):465-74.
31. Freedman AR, Galfre G, Gal E, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Western immunoblotting of cereal proteins with monoclonal antibodies to wheat gliadin to investigate coeliac disease. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1988; 85(3):346-50.
32. Miletic ID, Miletic VD, Miller Sattley EA, Schiffman SS. Identification of gliadin presence in pharmaceutical products. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1994; 19(1):27-33.
33. Eckert van R, Berghofer E, Ciclitira PJ, Chirido F, Denery-Papini S, Ellis HJ, et al. Towards a new gliadin

- reference material- isolation and characterization. *J Cereal Sci.* 2006; 43(3):331-41.
34. Klein C, Yazgan S, Franchini F. The certified reference material for gliadin from European wheat: status quo. In Stern M, ed. *Proceedings of the 18th Meeting Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, October 2-5, 2003, Stockholm, Sweden. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten 2004: 125-7.
35. Garcia E, Llorente M, Hernando A, Kieffer R, Wieser H, Mendez E. Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 17(5):529-39.
36. Friss U. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of cereal proteins toxic in coeliac disease. *Clin Chim Acta.* 1988; 178(3):261-70.
37. Troncone R, Vitale M, Donatiello A, Farris E, Rossi G, Auricchio S. A sandwich enzyme immunoassay for wheat gliadin. *J Immunol Methods* 1986; 92(1):21-3.
38. Freedman AR, Galfre G, Gal E, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Monoclonal antibody ELISA to quantitate wheat gliadin contamination of gluten-free foods. *J Immunol Methods.* 1987; 98(1):123-7.
39. Chirido FG, Amon MC, Fossati CA. Optimization of a competitive ELISA with polyclonal antibodies for quantification of prolamins in foods. *Food Agric Immunol.* 1995; 7(4):333-43.
40. Denery-Papini S, Nicolas Y, Popineau Y. Efficiency and limitations of immunochemical assay for the testing of gluten-free foods. *J Cereal Sci.* 1999; 30(2): 121-31.
41. Rumbo M, Chirido FG, Fossati CA, Amon MC. Influence of thermal treatment of food on the immunochemical quantification of gliadin. *Food Agric Immunol.* 1996; 8(3):195-203.
42. Wieser H. Quantitative determination of gliadin subgroups from different wheat cultivars. *J Cereal Sci.* 1994a: 19(2):149-55.
43. Osman AA, Uhlig HH, Valdes I, Amin M, Mendez E, Mothes T. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001; 13(10):1189-93.
44. Méndez E, Vela C, Immer U, Janssen FW. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 17(10):1053-63.
45. Iametti S, Bonomi F, Ferranti P, Picarielo G, Gabrovská D. Characterization of gliadin content in beer by using different approaches In; Stern M, ed.. *Proceedings of the 19th Meeting of the Working on Prolamin Analysis and Toxicity*, September 30-October 3, 2004, Prague, Czech Republic. Zwickau: Verlag Wissenschaftli Scripten 2005: Verlag Wissenschaftliche Scripte 2005; 73-8.