

## **CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP**

### **RELATÓRIO DE CONSULTA**

**TÍTULO DO PROJETO:** “Desenvolvimento de produto de panificação à base de amaranto (*Amaranthus cruentus* L., BR-Alegria) enriquecido com cálcio e fibras prebióticas para aumento da densidade mineral óssea de crianças e adolescentes celíacos”

**PESQUISADORA:** Vanessa Dias Capriles

**ORIENTADOR:** José Alfredo Gomes Arêas

**INSTITUIÇÃO:** Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

**FINALIDADE:** Doutorado

**PARTICIPANTES DA ENTREVISTA:** Carlos Alberto de Bragança Pereira  
Cláudia Monteiro Peixoto  
José Alfredo Gomes Arêas  
Vanessa Dias Capriles  
César Henrique Torres  
Ricardo Jovanini de Souza Lima  
Tatiana Kovach Hayashida

**FINALIDADE DA CONSULTA:** Assessoria na Análise Estatística dos Dados

**DATA:** 30/08/2005

**RELATÓRIO ELABORADO POR:** Ricardo Jovanini de Souza Lima  
Tatiana Kovach Hayashida

## 1. Introdução

A doença celíaca é uma enteropatia inflamatória causada pela intolerância permanente, por parte de indivíduos geneticamente suscetíveis, à ingestão de glúten. Uma dieta isenta desta substância é o único tratamento para esta doença, ainda sem cura. Há dificuldades para a continuidade do tratamento, pois a maioria dos alimentos apresenta glúten em sua composição. Além disso, há poucas opções de produtos industrializados específicos para esta população (Goggins, Kelleher 1994; Barbieri, Koda 1996; Maki, Collin 1997; Utiyama, Ioshii 1998).

Os portadores desta doença, freqüentemente, apresentam densidade mineral óssea reduzida, fazendo com que o risco de osteoporose e fraturas nesses indivíduos seja sete vezes maior que o dos não portadores. O tratamento e a prevenção da osteoporose em celíacos envolvem a manutenção da dieta isenta de glúten e adequada ingestão de cálcio e de vitamina D. A ingestão de cálcio neste grupo populacional é baixa e intervenções com suplementação medicamentosa de cálcio e vitamina D já foram tentadas sem benefícios adicionais ao tratamento (Carecini et al, 1988; Mazure et al, 1994; Molteni et al, 1990; Bode et al, 1991; Mora et al, 1993, 1998; Valdimarsson et al, 1994; Corazza et al, 1995; McFarlane et al, 1995; Walters et al, 1995; Burrows et al, 1999; Carvalho, 1999, 2003; Vasquez et al, 2000; Szathmári et al, 2001; Silva, 2003).

Este trabalho propõe-se a desenvolver e avaliar o impacto da ingestão de um produto de panificação à base de amaranto – pseudocereal isento de glúten que apresenta elevado valor nutritivo e teor de cálcio (Becker et al, 1981; Teutonico, Knorr, 1985; Bressani et al, 1993; Yañez et al, 1994) – enriquecido com cálcio e fibras prebióticas – ingredientes alimentares que auxiliam, dentre outras propriedades, no aumento da absorção de cálcio (Gibson, Roberfroid, 1995; Hartemink et al, 1997; Roberfroid, 2000, 2001; Machado et al, 2001) – na densidade mineral óssea de crianças e adolescentes celíacos. Este produto alternativo pode ser capaz de reduzir o risco de osteoporose observado neste grupo populacional.

A consulta teve por finalidade a orientação na coleta de dados.

## 2. Descrição do Estudo

O objetivo deste estudo é avaliar o impacto da ingestão de um produto de panificação à base de amaranto e enriquecido com fibras prebióticas e cálcio, na densidade mineral óssea de celíacos em idade pediátrica.

Para isso será necessário:

- Definir o produto a ser desenvolvido, entre pão, biscoito e bolo, de acordo com a preferência a ser relatada por uma amostra de crianças e adolescentes celíacos.
- Desenvolver três formulações do produto definido, mantendo uma alta aceitabilidade sensorial pelas crianças e adolescentes celíacos da amostra:
  - a base de amaranto (controle);
  - a base de amaranto e enriquecido com cálcio;
  - a base de amaranto e enriquecido com cálcio e fibras prebióticas.
- Avaliar a viabilidade do consumo destes produtos para a população celíaca através da comprovação da isenção de glúten.
- Determinar a vida de prateleira destes produtos.
- Realizar o estudo clínico e verificar o impacto do consumo dos produtos desenvolvidos na reserva de cálcio nos ossos de crianças e adolescentes celíacos da amostra.

Para atingir os objetivos, o projeto será desenvolvido em duas fases:

### **Fase 1:** Desenvolvimento do produto e avaliação da sua vida de prateleira

#### 1- Caracterização dos produtos desenvolvidos

- Análise de **composição centesimal**: Realizada através das análises descritas a seguir:
  - umidade por dessecação a 105°C até peso constante;
  - cinzas por incineração do alimento em Mufla a 550°C até peso constante;

- proteína pela técnica micro-Kjeldhal para determinação do nitrogênio total - fator de correção 6,25xN;
  - lipídios por extração em coluna seca e secagem do solvente a 105°C;
  - fração fibra alimentar será determinada por método enzimico-gravimétrico;
  - amido total por hidrólise enzimática;
  - Resultados são obtidos em g/100 e serão expressos em valores percentuais resultantes da média de três determinações.
- **Teor de cálcio:** A dosagem de cálcio no amaranto e nos produtos desenvolvidos será realizada através de digestão úmida da matéria orgânica e leitura da concentração do elemento na amostra em espectrofotômetro de absorção atômica equipado com lâmpada de cátodo oco específica para o cálcio, utilizando-se comprimento de onda 422,7 nm. Resultado expresso em mg de cálcio/100g do alimento, resultado representa a média de três determinações.
- **Detecção de glúten** nas formulações serão realizadas através do método de ELISA. Resultado expresso em mg de gliadina/kg do produto, resultado representa a média de três determinações.
- A **cor** será verificada através do sistema CIE L \*a\*b\* em aparelho Color Quest XE (Hunter lab.). O colorímetro fornece os valores de L \*,a\*,b\* a partir dos quais serão determinados a pureza da cor (croma) e o ângulo de tom no espaço de cores. Resultados expressos resultam da média entre três determinações.
- A **textura** será analisada em texturômetro Texture Analyser-TA-XT2i através do teste de perfil de análise de textura e avaliação da força necessária para o cisalhamento ou outros testes recomendados para o tipo de produto adotado. Resultados expressos em Newtons, referentes à média de quinze determinações.

- **Análise sensorial** será realizada com crianças e adolescentes celíacos para avaliar a aceitação da formulação padrão e das variantes tanto do produto teste como do controle; para isso será aplicado um teste afetivo, com escala hedônica de nove pontos (1 - desgostei muitíssimo, 5 - indiferente, 9 - gostei muitíssimo). Resultados expressam a nota média atribuída ao produto.

## 2- Determinação da vida de prateleira

Para garantir a segurança do consumo dos produtos durante a fase de intervenção nutricional será realizada a determinação da vida de prateleira. Para isso, após a produção, serão armazenadas amostras de cada formulação em embalagem específica. Estas amostras serão acondicionadas em ambiente com controle de variação de temperatura e umidade. Será realizado um ensaio de vida de prateleira até o momento no qual os produtos tornem-se inadequados para o consumo, quer seja por perda da qualidade sensorial ou microbiológica. Inicialmente serão realizadas as determinações laboratoriais e, após a vida de prateleira ser determinada, será realizado um novo ensaio para averiguar a aceitabilidade sensorial durante o período; a vida de prateleira será definitivamente estipulada nesta fase.

## Fase 2: Estudo clínico

### 1- Seleção dos participantes

Serão candidatos para este estudo crianças e adolescentes celíacos diagnosticados de acordo com as recomendações da *European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*, com a doença confirmada há mais de seis meses e apresentando função digestivo-absortiva normal.

Os possíveis participantes serão selecionados junto a um ambulatório de gastroenterologia pediátrica. Seguindo a resolução específica do Conselho Nacional de Saúde (nº 196/96), as crianças e adolescentes celíacos e seus respectivos

responsáveis serão informados, detalhadamente, sobre os objetivos e procedimentos a serem utilizados na realização deste trabalho, assegurando-lhes a proteção da privacidade. Caso concordem em participar da pesquisa deverão assinar um termo de consentimento. Os participantes e respectivos responsáveis serão orientados a manterem seus hábitos alimentares e atividades físicas.

Não serão selecionados para este estudo aqueles que fizerem uso de suplementação terapêutica de cálcio, vitamina D, apresentem hipertireoidismo, estiverem em uso de corticóide ou terem apresentado infecções e diarreias nos últimos cinco meses.

O presente estudo irá analisar os efeitos da suplementação da dieta com produto de panificação a base de amaranto enriquecido com cálcio adicionado ou não de fibras prebióticas. Este efeito é observado na densidade mineral óssea de crianças e adolescentes celíacos selecionados aleatoriamente para ingerir diariamente um dos produtos teste (P1, P2) ou o controle (P3), durante seis meses.

Cada paciente será orientado a consumir um mínimo de duas porções/dia em horários espaçados das refeições principais para evitar competição entre nutrientes. Os pacientes receberão em domicílio determinada quantidade de produto com data em que deve ser consumido registrada na embalagem; a frequência de produção e distribuição dos produtos será determinada de acordo com a vida de prateleira.

### 3. Descrição das Variáveis

- **Consumo Alimentar:** Será realizado o registro alimentar de três dias antes do início do período de intervenção com a finalidade de avaliar a ingestão de cálcio habitual e a adequação da dieta. O mesmo registro será repetido ao meio e ao final do estudo para observar eventuais alterações de padrão de consumo. Serão avaliadas as seguintes quantidades:

- Proteína (em %);
- Carboidratos (em %);
- Lipídios (em %);

- Fibras (em gramas);
- Cálcio (em gramas);
- Ferro (em mg);
- Análise quantitativa da dieta em valor calórico (em Kcal);
- Análise quantitativa da dieta em valor absoluto (em g).

- **Estado Nutricional:** Expressos em escore z, conforme proposto pela OMS (1995), seguindo a referência antropométrica do *National Center of Health Statistics*. Estes dados serão coletados ao início e término do estudo.

- Índices peso/idade (P/I);
- Estatura/idade (E/I);
- Peso/estatura (P/E).

- **Densidade Mineral Óssea:** Será medida através de densitometria de dupla emissão com fonte de raios X (DEXA - DPX Lunar). A densidade mineral (g/cm<sup>2</sup>) será avaliada na coluna lombar (L2 - L4) em todos os pacientes ao início e término do estudo.

- **Idade:** Idade do paciente no início do experimento, expressa em anos.

- **Sexo**

#### 4. Situação do Projeto

O projeto encontra-se em fase inicial e não há dados coletados. Para esta coleta, o CEA está disponibilizando um *software* desenvolvido em Access que irá fazer o controle amostral e permitir um acompanhamento dos pacientes. A alocação dos pacientes nos grupos é feita da seguinte forma:

1. Os três primeiros pacientes, aleatoriamente, serão distribuídos um em cada tratamento, e suas medidas de densidade mineral óssea, idade e sexo serão armazenadas.
2. Após os tratamentos já possuírem pelo menos um paciente, cada ingressante será alocado no grupo que apresentar os valores médios de cada variável (densidade mineral óssea, idade e sexo) mais distantes das medidas deste paciente, buscando, assim, homogeneizar os grupos. Em caso de distâncias iguais, o indivíduo será alocado no grupo com a menor quantidade de pacientes. Caso ainda não se chegue a um consenso, o mesmo será alocado de forma aleatória em um dos grupos onde prevaleça o empate. Para o cálculo da distância, imagina-se que o paciente e cada tratamento são pontos no espaço (tridimensional) e, então, toma-se a distância euclidiana do indivíduo para cada grupo. Como exemplo, pode-se considerar que se tenha sete pacientes já alocados nos grupos, conforme segue:

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
	(5,00; 4,00; 0,00)	(4,00; 6,00; 1,00)	(3,00; 2,00; 1,00)
	(3,00; 5,00; 0,00)		(5,00; 5,00; 1,00)
	(1,00; 2,00; 0,00)		
Média do Grupo	(3,00; 3,67; 0,00)	(4,00; 6,00; 1,00)	(4,00; 3,50; 1,00)

onde o vetor  $(x; y; z)$  significa que o paciente possui densidade mineral óssea igual a  $x$  g/cm<sup>2</sup>, idade igual a  $y$  anos e é do sexo masculino se  $z$  igual a 1 e feminino se  $z$  igual a 0. Supondo o ingresso de um paciente com os dados (3,00; 2,00; 1,00), temos que a distância euclidiana dele para o grupo 1 é de  $\sqrt{(3,00 - 3,00)^2 + (2,00 - 3,67)^2 + (1,00 - 0,00)^2} = 1,95$ . Para o grupo 2 a distância é de 4,12 e para o grupo 3, 1,80. Nota-se que o grupo mais distante ao paciente é o 2, que é onde o mesmo será alocado.



Com esta forma de alocação, a quantidade de pacientes em cada grupo poderá não ser a mesma, porém, isto não implicará problemas na análise estatística.

3. Após a primeira coleta de dados (aproximadamente três meses depois do início do experimento), caso algum(ns) grupo(s) apresente(m) melhor(es) resultado(s) em relação aos demais, os novos pacientes serão alocados apenas neste(s) grupo(s). Sendo mais de um grupo, o critério de alocação será igual ao descrito no item 2.

## **5. Sugestões do CEA**

Depois de obtidos todos os dados, a análise dos mesmos pode ser feita, inicialmente, utilizando medidas resumo, como médias e desvios padrão, e gráficos, como “box-plot” e perfis de média para descrever e resumir os dados e verificar o comportamento de cada variável quanto à sua distribuição. Pontos aberrantes devem ser analisados individualmente para verificar se seus valores foram corretamente registrados, ou ainda para dar subsídios sobre a necessidade de se adotar análises robustas.

Posteriormente, para comparar os dois grupos em estudo (vitamina A e controle), sugere-se a técnica de análise de variância (Neter et al., 1996) para analisar o comportamento médio das variáveis em estudo.

## **6. Conclusão**

Quando a coleta de dados estiver completa, sugere-se o encaminhamento do projeto para estatísticos experientes analisarem. Informou-se sobre os procedimentos do CEA para seleção de novos projetos para o curso de Estatística Aplicada.

## 7. Referências Bibliográficas

BARBIERI, D., KODA, Y.K.L. (1996). **Doenças Gastroenterológicas em Pediatria**. São Paulo: Atheneu. p.176-188.

BECKER, R., WHELLER, L. E., LORENZ, K., STAFFORD, A. E., GROSJEAN, O. K., BETSCHART, A. A., SAUNDERS, R. M. (1981). **A compositional study of amaranth grain**. J. Food Sci. 46: 1175-1180.

BODE, S., HASSAGER, C., GUDMAND-HOYER, E., CHRISTIANSEN, C. (1991). **Body composition and calcium metabolism in adult treated coeliac disease**. *Gut*. 32: 1342-1345.

BRESSANI, R., MARTELL, E. C. M. D., GODÍNEZ, C. M. D. (1993). **Protein quality evaluation of amaranth in adult humans**. Plant Foods for Human Nutrition. 43: 123-143.

BURROWS, R., LEIVA, L., BURGUEÑO, M., LILLO, R., PUMARINO, H., RÍOS, G., CHÁVEZ, E., BERGENFIELD, C., MUZZO S. (1999). **Bone mineral density (BMD) in children with celiac disease: Its relation to puberty and calcium intake**. Nutrition Research. 19(4): 493-499.

BUSSAB, W. O. e MORETTIN, P. A. (2002). **Estatística Básica**. 5. ed. São Paulo: Saraiva. 540p.

CARACENI, M. P., MOLTENI, N., BARDELLA, M. T., ORTOLANI, S., NOGARA, A., BIANCHI, P. A. (1988). **Bone and mineral metabolism in adult celiac disease**. Am. J. Gastroenterol. 83: 274-277.

CARVALHO, C. N. D. M. (1999). **Composição corporal, antropometria e avaliação dietética de pacientes pediátricos portadores de doença celíaca.** São Paulo: Tese de doutorado Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

CARVALHO, C. N. D. M., SDEPANIAN, V. L., MORAIS, M. B. D., FAGUNDES NETO, U. (2003). **Doença celíaca em tratamento: avaliação da densidade mineral óssea.** Jornal de Pediatria. 79(4): 303-307.

CORAZZA, G. R., DI SARIO, A., CECCHETTI, L. (1995). **Bone mass and metabolism in patients with celiac disease.** Gastroenterology. 109: 122-128

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. (1995). **Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.** J. Nutr. 125 (6): 1401-1412.

GOGGINS, M., KELLEHER, D. (1994). **Celiac disease and other nutrient related injuries to the gastrointestinal tract.** Am. J. Gastroenterol. 89(8):S2 – S17.

HARTEMINK, R., VANLAERE, K. M. J., ROMBOUTS, F. M. (1997). **Growth of enterobacteria on fructooligosaccharides.** Journal of Applied Microbiology. 83: 367-374.

MACHADO, D. F., SILVA, R. R., FANCHIOTTI, F. E., COSTA, N. M. B. (2001). **Probióticos , prebióticos e simbióticos e seus efeitos na biodisponibilidade do cálcio.** Nutrire. 22: 73-83.

MAKI, M., COLLIN, P. (1997). **Coeliac disease.** Lancet. 349: 1755-9.

MAZURE, R., VASQUEZ, H., GONZALEZ, D. (1994). **Bone mineral affection in asymptomatic adult patients with celiac disease.** Am. J. Gastroenterol. 89: 2130-2134.

MCFARLANE, X. A., BHALLA, A. K., REEVES, D. E., MORGAN, L. M., ROBERTSON, D. A. (1995). **Osteoporosis in treated adult coeliac disease.** Gut. 36: 710-714.

MOLTENI, N., CARACENI, M. P., BARDELLA, M. T., ORTOLANI, S., GANDOLINI, G. G., BIANCHI, P.(1990). **Bone mineral density in adult celiac patients and the effect of gluten-free diet from childhood.** Am. J. Gastroenterol. 85: 51-53.

MORA, S., WEBER, G., BARERA, G., et al. (1993). **Effect of gluten-free diet on bone mineral content in growing patients with celiac disease.** Am. J. Clin. Nutr. 57: 224 8.

MORA, S., BARERA, G., RICOTTI, A., WEBER, G., BIANCHI, C., CHIUMELLO, G. (1998). **Reversal of flow bone density with a gluten-free diet in children and adolescents with celiac disease.** Am. J. Clin. Nutr. 67: 4770-4481.

NETER, J., KUTNER, M. H., NACHTSHEIM, C. J. and WASSERMAN, W. (1996). **Applied Linear Statistical Models.** 4. ed. Boston: Mc Graw Hill. 1408p.

ROBERFROID, M. B. (2000). **Prebiotics and probiotics: are they functional foods?** Am. J. Clinical Nutrition. 71 (6): 1682S-1687S.

ROBERFROID, M. B. (2001). **Prebiotics: preferential substrates for specific germs?** Am. J. Clinical Nutrition. 73 (2): 406S-409S.

SILVA, G. A. Pd. (2003). **Doença celíaca: repercussões na mineralização óssea.** Jornal de Pediatria. 79(4): 282-283.

SZATHMÁRI, M., TULASSAY, T., ARÁTO, A., BODÁNSKY, H., SZABÓ, A., TULASSAY, Z. (2001). **Bone mineral content and density in asymptomatic children with coeliac disease on a gluten free diet.** Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13: 419-24.

TEUTONICO, R. A., KNORR, D. (1985). **Amaranth, composition, proprieties and applications of a rediscovered food crop.** Food Technol. 39(4): 49-60.

UTIYAMA, S. R., IOSHII, S. (1998). **Doença celíaca: uma visão atual.** Rev. Bras. An. Clín. 30(3): 151-154.

VALDIMARSSON, T., TOSS, G., ROSS, I., LÖFMAN, O., STRÖM, M. (1994). **Bone mineral density in celiac disease.** Scand. J. Gastroenterol. 29: 457-461.

VASQUEZ, H., MAZURE, R., GONZALEZ, D., FLORES, D., PEDREIRA, S., NIVELONI, S., SMECUOL, E., MAURINO, E., BAI, J.C. (2000). **Risk of fractures in celiac disease patients: a cross-sectional, casecontrol study.** Am. J. Gastroenterol. 95: 183 9.

WALTERS, J. R. F., BANKS, L. M., BUTCHER, G. P., FOWLER, C. R. (1995). **Detection of low bone mineral density by dual energy absorptiometry in unsuspected suboptirnally treated coeliac disease.** Gut. 37: 220-224.

YÑEZ, E., ZACARIAS, I., GRANGER, D., VÁSQUEZ, M., ESTEVEZ, A. M. (1994). **Caracterizacion química y nutricional del amaranto (*Amaranthus cruentus*).** Arch Latinoam Nutr. 44(1): 57-62.