



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química
Projeto final de curso



**Aplicação das técnicas de cromatografia gasosa de
alta resolução e PCR em tempo real na análise da
autenticidade de azeite de oliva extra-virgem**

Tatiane Corrêa de Oliveira

Rio de Janeiro

Janeiro/2014

Aplicação das técnicas de cromatografia gasosa de alta resolução e PCR em tempo real na análise da autenticidade de azeite de oliva extra-virgem

Autora:

Tatiane Corrêa de Oliveira

Projeto final submetido à banca examinadora, como requisito para conclusão do Curso de Química com Atribuições Tecnológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientador:

Alexandre Guedes Torres (IQ-UFRJ)

Co-orientadoras:

Edna Maria Morais Oliveira (Embrapa Agroindústria de Alimentos)

Vanessa Naciuk Castelo-Branco

Rio de Janeiro

Janeiro/2014

Oliveira, Tatiane Corrêa de.

Aplicação das técnicas de cromatografia gasosa de alta resolução e PCR em tempo real na análise da autenticidade de azeite de oliva extra-virgem/Tatiane Corrêa de Oliveira – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2014.64f.

Dissertação (Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Matemática e da Natureza, Instituto de Química / DBQ, 2014.

Orientadores: Alexandre Guedes Torres, Edna Maria Morais Oliveira e Vanessa Naciuk Castelo-Branco.

1. Azeite de oliva. 2. Óleo de soja. 3. PCR em tempo real. 4. Cromatografia a gás. I. Torres, Alexandre Guedes (Orient.) II. Oliveira, Edna Maria Morais (Orient.) III. Castelo-Branco, Vanessa Naciuk (Orient.) IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me dado força e coragem para chegar até esse momento tão esperado da minha graduação.

Aos meus pais, Juarez e Katia, agradeço por tudo que sou hoje. Pelo amor, paciência, carinho e dedicação por mim. Amo vocês!

A minha irmã, Cristiane, que me ajudou em muitos momentos e que também contribuiu para eu ser quem sou hoje.

Ao meu namorado, Manoel Vitor, que mesmo de longe está sempre disposto para me ajudar em todos os momentos, para me acalmar e orientar nas horas de desespero e que me proporciona tantos momentos maravilhosos. Te amo!

A toda minha família agradeço pela paciência e compreensão em todos os momentos de ausência causados por atribulações decorrentes do meu estudo e da correria da maioria dos dias.

Ao meu orientador, Professor Alexandre Guedes Torres, que esteve presente na minha vida acadêmica desde o meu segundo período de graduação, e que, sem dúvida, contribuiu para o meu crescimento profissional.

A minha co-orientadora, Dra Edna Maria Morais Oliveira, agradeço do fundo do meu coração por toda a confiança depositada em mim, todo o carinho, incentivo e ajuda. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa que você é na vida de todos que te conhecem!

A minha co-orientadora, Dra Vanessa Naciuk, agradeço imensamente por toda a paciência comigo desde os tempos da Iniciação Científica até hoje. Muito obrigada por sua dedicação e ajuda.

Aos meus amigos da Embrapa, Dr Otniel, Andressa, Ivan, Thiago, Ivanilda, Natália, Andrea e Felipe, que além de me ajudarem direta ou indiretamente nesse trabalho, são pessoas maravilhosas que eu adoro e que fazem toda a diferença no meu dia a dia.

As minhas amigas queridas de graduação, Lorena, Fernanda, Natalia, Renata e Nathalia, e aos meus amigos Renan e Vitor, que contribuíram muito para que eu chegasse até aqui. Sem dúvida nenhuma o tempo que passo na faculdade não seria tão bom se não fosse por vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES: FIGURAS E TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVO.....	3
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Fraudes em azeites de oliva extra-virgem.....	4
2. Utilização da técnica de cromatografia gasosa na detecção de fraudes em azeites de oliva extra-virgem.....	5
3. Utilização de método baseado na reação em cadeia da DNA polimerase na detecção de fraudes em azeites de oliva extra-virgem.....	7
a. PCR qualitativa.....	7
b. PCR em tempo real	8
4. Uso de ferramentas da bioinformática na construção de oligonucleotídeos iniciadores para detecção de sequências específicas de DNA.....	11
IV – MATERIAL E MÉTODOS.....	12
A. Amostras.....	12
B. Análise por cromatografia gasosa.....	12
1. Saponificação.....	12
2. Purificação (extração em fase sólida – cartucho Si-SPE).....	13
3. Sililação.....	14
4. Cromatografia gasosa.....	16
C. Análise por PCR em tempo real.....	18
1. Extração de DNA genômico.....	18
2. Reação de PCR-RAPD.....	18
3. Eletroforese em gel de agarose.....	19

4.	Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados.....	19
5.	PCR em tempo real.....	20
V – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		20
A.	1 – Análise por cromatografia gasosa de alta resolução.....	20
B.	Análise por PCR em tempo real.....	24
1.	Seleção do melhor método de extração de DNA.....	24
2.	PCR em tempo real.....	26
2.1.	Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados.....	26
2.2.	Análise da especificidade dos <i>primers</i>	28
2.3.	Análise da técnica de PCR em tempo real em relação a sua capacidade em detectar a presença de óleo de soja em azeite de oliva extra-virgem adulterado intencionalmente.....	35
VI – CONCLUSÃO.....		37
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		39
ANEXO A.....		42
ANEXO B.....		44
ANEXO C.....		45
ANEXO D.....		46
ANEXO E.....		47
ANEXO F.....		48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES: FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás.....	5
Figura 2. Estrutura química dos fitoesteróis majoritários na soja e no girassol.....	6
Figura 3. Representação esquemática da técnica de PCR.....	8
Figura 4. Comparação entre o funcionamento do sistema SYBR Green e do uso de sondas.....	9
Figura 5. Exemplo de curva de amplificação por PCR em tempo real (a) e curva de dissociação (b).....	10
Figura 6. Esquema da reação de saponificação dos fitoesteróis.....	12
Figura 7. Esquema da reação de sililação, aplicada na derivatização dos fitoesteróis para análise por cromatografia em fase.....	14
Figura 8. Diagrama ilustrando as principais etapas de processamento e análise dos fitoesteróis por Cromatografia Gasosa de alta resolução (F = fitoesteróis totais, RS = reagente de sililação, T _{amb} = temperatura ambiente).....	15
Figura 9. Perfil de fragmentos amplificados por PCR-RAPD a partir de diferentes métodos de extração de DNA (gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio, condições da corrida eletroforética: 150 mV/150 A). OS = óleo de soja, AOEV = azeite de oliva extra-virgem, CN = controle negativo da reação (água milliQ) e CP = controle positivo da reação (DNA genômico de soja).....	25
Figura 10. Resultado da PCR <i>in silico</i> para o par de <i>primers</i> Olea93: 100% de anelamento entre os <i>primers</i> e o respectivo DNA molde.....	27
Figura 11. Resultado da PCR <i>in silico</i> para o par de <i>primers</i> Lec77 (He <i>et al.</i> , 2013): 100% de anelamento entre os <i>primers</i> e o respectivo DNA molde.....	27
Figura 12. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de azeitona com o par de <i>primers</i> Olea93.....	28

Figura 13. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de azeitona com o par de primers Lec77.....	29
Figura 14. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de soja com o par de primers Olea93.....	30
Figura 15. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de soja com o par de primers Lec77.....	30
Figura 16. Curva padrão construída a partir de reação de PCR em tempo real de DNA de azeitona com o par de <i>primer</i> Olea93 (1=DNA de azeitona sem diluição, 2=DNA de azeitona 5X diluído, 3=DNA de azeitona 10X diluído, 4=DNA de azeitona 50X diluído e 5=DNA de azeitona 100X diluído).....	31
Figura 17. Curva padrão construída a partir de reação de PCR em tempo real de DNA de soja com o par de <i>primer</i> Lec77 (1=DNA de soja sem diluição, 2=DNA de soja 5X diluído, 3=DNA de soja 10X diluído, 4=DNA de soja 50X diluído e 5=DNA de soja 100X diluído).....	32
Figura 18. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de soja e óleo de soja com o par de primers Lec77.....	34
Figura 19. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de azeitona e azeite de oliva extra-virgem com o par de primers Olea93.....	34
Figura 20. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA das adulterações intencionais de azeite de oliva extra-virgem com óleo de soja, com os pares de primers Olea93 e Lec77, utilizando-se como padrão interno DNA de azeitona e de soja, respectivamente.....	36

TABELAS

Tabela 1. Condições das injeções realizadas no cromatógrafo Shimadzu GC-14B.....	17
Tabela 2. Metodologias testadas para a etapa de derivatização (FO = fração oxidada, FNO = fração não-oxidada, I = hexano, II = isopropanol, T _{amb} = temperatura ambiente e * = extrato seco).....	22
Tabela 3. Concentração de DNA de azeitona, soja, azeite de oliva extra-virgem e óleo de soja.....	25
Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	26
Tabela 5. Determinação dos limites de detecção e de quantificação para o primer Olea93.....	32
Tabela 6. Determinação dos limites de detecção e de quantificação para o primer Lec77.....	33
Tabela 7. Eficiência dos primers Olea93 e Lec77.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
°C	graus Celsius
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COI	Conselho Oleícola Internacional
C _t	Ciclo de Threshold
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FEA	Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp
g	grama
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
m	Metro
M	Molar
mA	Miliampère
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
µg	Micrograma
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mm	Milímetro
µm	Micrometro
mM	Milimolar

μM	Micromolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OLIVA	Associação Brasileira de Produtores, Importadores e Comerciantes de Azeite de Oliveira
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PTV	Programmed Temperature Vaporization
RAPD	Randon Amplified Polymorphic DNA
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
TBE	Trisborato de EDTA
T_m	Temperatura de melting
UV	Ultravioleta
V	Volt

RESUMO

PROJETO DE CURSO – IQWX01

TÍTULO: Aplicação das técnicas de cromatografia gasosa de alta resolução e PCR em tempo real na análise da autenticidade de azeite de oliva extra-virgem

ALUNA: Tatiane Corrêa de Oliveira

ORIENTADOR: Prof^o Alexandre Guedes Torres, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

CO-ORIENTADORAS: Dr^a Edna Maria Morais Oliveira – Embrapa Agroindústria de Alimentos e Dr^a Vanessa Naciuk Castelo-Branco

O consumo do azeite de oliva sofreu um grande aumento nos últimos anos devido ao seu sabor diferenciado e também devido à sua composição nutricional, rica em compostos bioativos. A rotulagem correta de alimentos é essencial para garantir a segurança e os direitos do consumidor de escolha dos alimentos ou marcas comerciais. Nesse aspecto, a autenticidade dos alimentos é extremamente relevante, pois trata da adequada informação ao consumidor quanto à natureza e à identidade do alimento que consome. Oficialmente, os métodos de determinação de óleos vegetais se baseiam no perfil químico de componentes dos óleos, especialmente ácidos graxos e fitoesteróis e/ou tocoferóis, porém métodos alternativos podem contribuir no controle da autenticidade de óleos vegetais de alto valor. O presente trabalho utilizou uma metodologia baseada em cromatografia gasosa de alta resolução (técnica recomendada pelo CODEX *Alimentarius*) e analisou a aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real, para detectar a presença de óleo de soja em azeite de oliva extra-virgem em amostras comerciais desse produto.

Soja, azeitona, óleo de soja e azeite de oliva extra-virgem foram utilizados e amostras de azeite de oliva extra-virgem foram intencionalmente adicionados de óleo de soja para verificar a capacidade de cada uma das técnicas utilizadas em detectar a presença do adulterante.

I. INTRODUÇÃO

O azeite de oliva destaca-se no cenário da indústria agroalimentícia por ser um produto de alto valor econômico e nutricional (Agrimonti *et al.*, 2011). Nas últimas décadas, o consumo do azeite de oliva sofreu um grande aumento especialmente devido à sua composição nutricional, rica em compostos bioativos, bem como pelo seu sabor diferenciado e muito apreciado. Entre os compostos bioativos presentes no azeite de oliva, os fitoesteróis são muito investigados devido ao seu potencial efeito benéfico à saúde humana, como inibidor da absorção do colesterol dietético e quimiopreventivo (Menendez, 2008 e Visioli & Galli, 2000). Além disso, os fitoesteróis podem ser utilizados no controle da autenticidade dos azeites de oliva, tendo em vista o perfil singular destes compostos no azeite.

Nos últimos anos os consumidores têm demonstrado um maior interesse em relação à procedência e a qualidade dos produtos que compram, especialmente em relação aos do gênero alimentício. As informações que devem estar nos rótulos são essenciais para o consumidor escolher um determinado alimento ou preferir uma determinada marca em relação à outra. Essa escolha normalmente reflete o estilo de vida do consumidor (vegetariano, preferência por produtos orgânicos), práticas religiosas (ausência de carne de porco para judeus e muçulmanos) além de restrições alimentares provocadas por problemas de saúde (doença celíaca, intolerância a lactose, alergias) e, por esse motivo, é extremamente importante que a rotulagem seja feita de maneira correta e honesta. Dessa forma, a autenticidade dos alimentos assumiu maior importância para garantir que consumidores possam fazer escolhas de forma mais consciente em relação aos alimentos que estão consumindo (Woolfe & Primrose, 2004).

Atualmente, o controle da autenticidade dos azeites de oliva tem sido foco de interesse científico e tecnológico devido a sua relevância para a economia da indústria de óleos vegetais, assim como para a saúde do consumidor. Diferentes técnicas são usadas para a avaliação da autenticidade de óleos vegetais, tais como: a espectrometria de massas de reação de transferência de prótons (PTR-MS), a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a espectroscopia do infravermelho, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia gasosa (CG) e, mais recentemente, a reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (He *et al.*, 2013).

A cromatografia gasosa foi selecionada para ser utilizada nesse trabalho, pois é a indicada pelo *CODEX Alimentarius* (www.codexalimentarius.org) para a determinação da composição em esteróis de óleos vegetais, sendo assim a técnica mais utilizada para este fim. Porém, métodos baseados no DNA são cada vez mais utilizados, visto que essa molécula apresenta estabilidade muito maior quando comparada a outras, como por exemplo, proteínas, além de não depender das condições ambientais, como é o caso dos métodos que se baseiam na composição química dos óleos (Costa, Mafra & Oliveira, 2012). Por esse motivo, a aplicabilidade de uma metodologia baseada na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) foi avaliada.

II. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo analisar a aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para a detecção de fraudes em azeite de oliva extra-virgem por adição de óleo de soja e compará-la a uma metodologia baseada em cromatografia gasosa.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Fraudes em azeites de oliva extra-virgem

A adulteração em alimentos pode ser feita de várias formas, tais como a substituição de ingredientes por outros similares e mais baratos, a adição de água, o uso de processamento industrial não declarado no rótulo, o qual pode alterar a composição nutricional do alimento, superestimando ingredientes (Woolfe & Primrose, 2004). No caso do azeite de oliva extra-virgem, um produto relativamente caro, a fraude pode ocorrer por meio da adição de um óleo mais barato, por exemplo, o óleo de soja, ou por meio da adição de um azeite de oliva mais processado, como o azeite de oliva virgem ou refinado (Wu *et al.*, 2008). A prática de adulteração do azeite de oliva extra-virgem resulta em informação nutricional errônea nos rótulos do produto. Além disso, caso seja adicionado algum componente que apresente alergenicidade, como o óleo de castanha-do-Brasil, de amêndoa ou de avelã, e que não conste no rótulo do produto, existe um possível risco para a saúde do consumidor (Arlorio & Coisson, 2010).

Existem alguns órgãos institucionais que monitoram e fiscalizam o mercado de azeites de oliva, indicando as marcas mais confiáveis. No Brasil existe a Associação Brasileira de Produtores, Importadores e Comerciantes de Azeite de Oliveira (OLIVA) e, na Espanha, o Conselho Oleícola Internacional (COI). A OLIVA, em parceria com o Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp (FEA) segue as recomendações do COI quanto a orientações e metodologias a serem aplicadas a fim de controlar as possíveis adulterações em azeite de oliva extra-virgem. Periodicamente são coletadas amostras no mercado brasileiro que são analisadas em relação a sua qualidade (características físico-químicas) e identidade pelos laboratórios parceiros do ITAL e da FEA, além de também ser enviada uma amostra para ser analisada pelo COI. No site da Associação OLIVA (www.oliva.org.br) podem ser encontradas algumas marcas que foram testadas.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou em 30 de janeiro de 2012 a primeira legislação nacional que define os padrões oficiais de classificação do azeite de oliva (Instrução Normativa nº1, MAPA), abordando requisitos como os de identidade. Nesse documento, o azeite de oliva é definido

como “o produto obtido somente do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.) excluído todo e qualquer óleo obtido pelo uso de solvente, por processo de re-esterificação ou pela mistura com outros óleos, independentemente de suas proporções”.

2. Utilização da técnica de cromatografia gasosa na detecção de fraudes em azeites de oliva extra-virgem

A técnica de cromatografia gasosa consiste na vaporização dos componentes de uma amostra seguida de sua separação em consequência da partição de cada composto entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária, localizada no interior da coluna (Skoog *et al.*, 2010). Na Figura 1 temos o diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás.

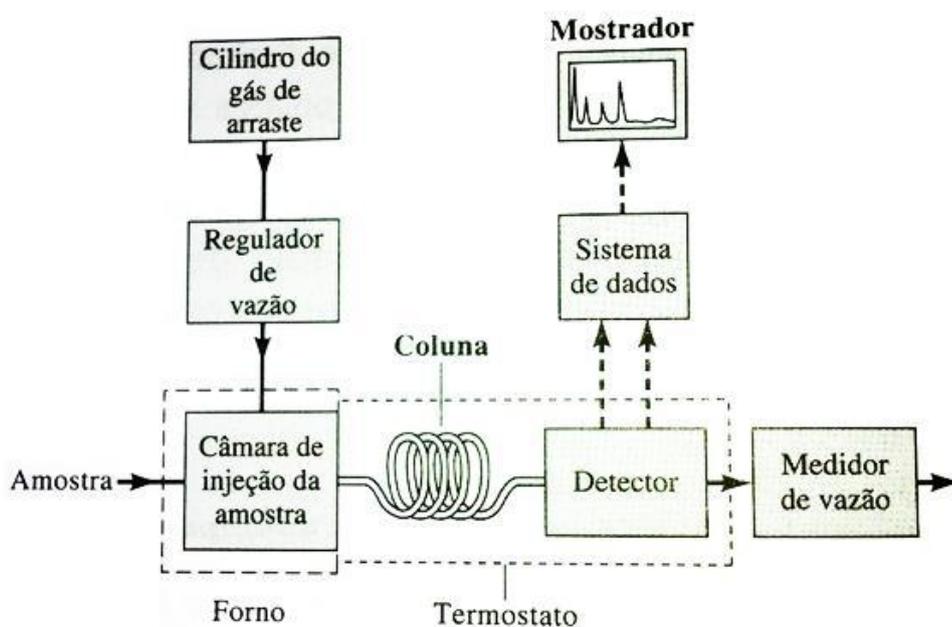


Figura 1. Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás (adaptado de Skoog *et al.*, 2010)

A amostra é injetada por meio de uma seringa através de um diafragma ou septo de silicone em uma região aquecida cerca 50 °C acima do ponto de ebulição do componente menos volátil da amostra, de forma a garantir que toda a amostra será volatilizada rapidamente. Essa região é localizada na cabeça da coluna e pode apresentar um divisor de fluxo (injeções do tipo *split* ou *splitless*), o qual pode desviar para a coluna um determinado volume conhecido da amostra enquanto o

restante é descartado, no caso de injeções do tipo *split*. A partir do momento em que a amostra entra na coluna, onde se tem a fase móvel que é um gás inerte, normalmente o hélio, e a fase estacionária, que pode ser sólida ou líquida, os compostos interagem de forma diferenciada com a fase estacionária e são eluídos pelo gás de arraste (fase móvel). Dessa forma, cada componente atinge o detetor em um tempo diferente e, cada um deles, conseqüentemente, apresenta um tempo de retenção característico e pode ser identificado através desse parâmetro no cromatograma resultante (Skoog *et al.*, 2010).

A avaliação da autenticidade de óleos por cromatografia em fase gasosa baseia-se na sua composição em fitoesteróis. Cada óleo, dependendo da sua origem vegetal, possui determinados fitoesteróis em maior concentração e isso pode ser utilizado como uma “identidade” para diferenciar azeite de oliva de óleo de soja, por exemplo. Os fitoesteróis encontrados em maior percentual no óleo de soja são β -sitosterol, campesterol e stigmasterol enquanto que no azeite de oliva são β -sitosterol e Δ -avenasterol, sendo assim possível fazer o reconhecimento e diferenciação entre eles (Itoh *et al.*, 1973). Conseqüentemente, caso um azeite de oliva seja adulterado com óleo de soja, o cromatograma dessa amostra além de apresentar picos característicos dos fitoesteróis presentes no azeite de oliva, apresentará também picos referentes aos fitoesteróis do óleo de soja, sendo assim possível a detecção da fraude (levando-se em consideração o limite de detecção do método).

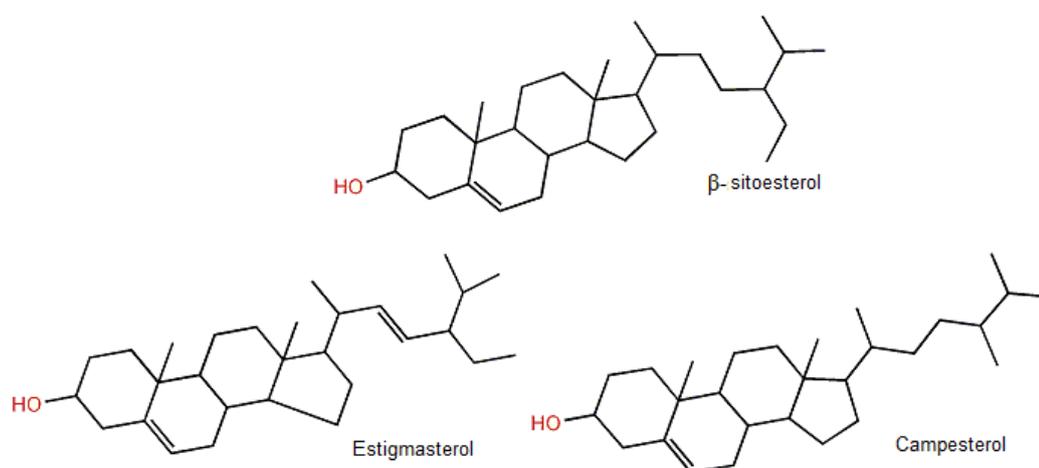


Figura 2. Estrutura química dos fitoesteróis majoritários na soja e no girassol (www.pherobase.com)

3. Utilização de método baseado na reação em cadeia da DNA polimerase na detecção de fraudes em azeites de oliva extra-virgem

a. PCR qualitativa

A reação em cadeia da DNA polimerase, ou PCR, consiste na amplificação de um segmento específico da molécula de DNA após a hibridização de dois pequenos segmentos a essa molécula, chamados de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*. Para que a reação ocorra são necessários, além do DNA e dos *primers*, a enzima Taq polimerase que é termoestável e responsável pela amplificação, nucleotídeos para a síntese das novas fitas de DNA, de tampão para a enzima e de magnésio, o co-fator enzimático (Barros *et al.*, 2009).

A PCR ocorre em etapas (Figura 3) nas quais os reagentes são submetidos a variações de temperatura durante diferentes intervalos de tempo. Pode-se estudá-la em quatro fases:

Fase 1) Desnaturação da dupla fita de DNA: as ligações de hidrogênio responsáveis por manter a dupla fita de DNA unida são rompidas devido ao aquecimento da mistura dos reagentes a 94 °C;

Fase 2) Anelamento dos *primers*: a temperatura é programada dentro do intervalo 50 – 60 °C (T_m , característica de cada *primer*) e ocorre a hibridização entre os oligonucleotídeos iniciadores e a fita simples de DNA em regiões específicas;

Fase 3) Amplificação: a Taq polimerase sintetiza uma fita complementar ao DNA molde a 74 °C, que é sua temperatura ótima;

Fase 4) Essas fases constituem um ciclo que se repete algumas vezes, resultando em milhares de cópias do fragmento de interesse.

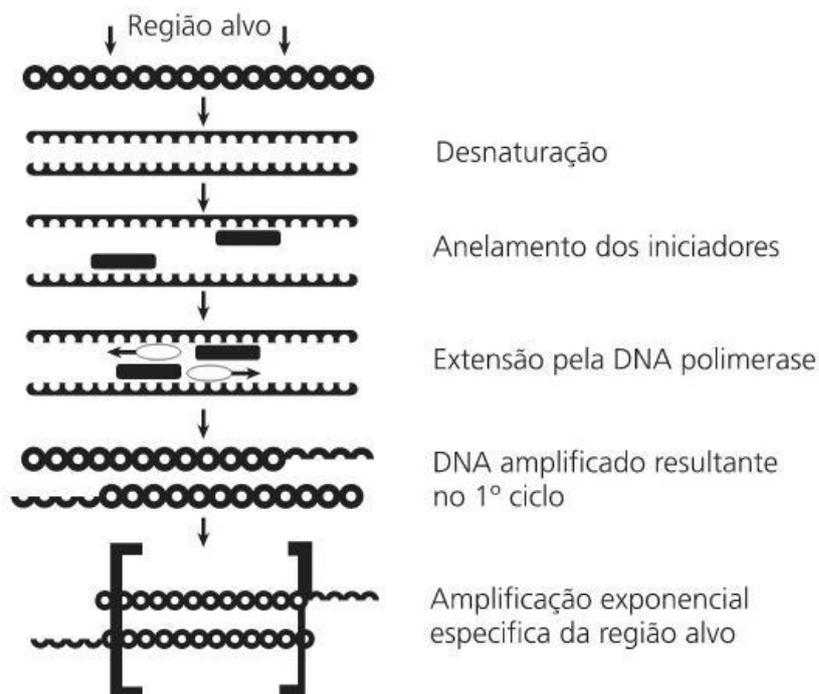


Figura 3. Representação esquemática da técnica de PCR (Barros *et al.*, 2009)

b. PCR em tempo real

Através da técnica de PCR em tempo real é possível acompanhar o progresso da reação ciclo a ciclo devido ao aumento progressivo da emissão de fluorescência pelos produtos formados, a qual é detectada pelo equipamento. Para que isso seja possível, utiliza-se um fluoróforo (SYBR Green) que se intercala na dupla fita de DNA conforme as novas moléculas vão sendo sintetizadas. Outra estratégia é o uso de sonda, pequeno oligonucleotídeo que em uma das suas extremidades apresenta um composto capaz de emitir fluorescência enquanto que na outra extremidade apresenta um composto que inibe a emissão de fluorescência. Quando essa sonda se anela ao produto da PCR e uma de suas extremidades se distancia da outra, ocorre a emissão da fluorescência. O mecanismo simplificado de ação do sistema SYBR Green e das sondas está esquematizado na Figura 4.

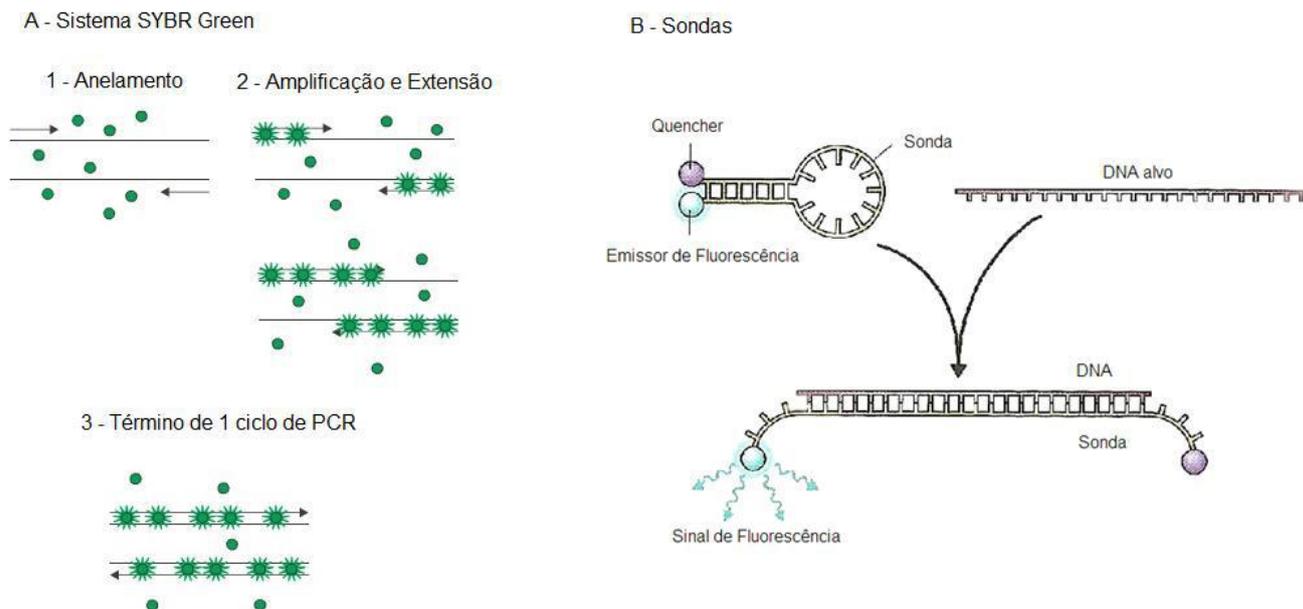


Figura 4. Comparação entre o funcionamento do sistema SYBR Green e do uso de sondas (<http://www.lifetechnologies.com> e T.A. Brown. Gene Cloning e DNA Analysis: an introduction. 6ª edição – Manchester: Willey-Blackwell, 2011)

As sondas apresentam maior especificidade em relação ao sistema SYBR Green, pois são compostas de sequências específicas de DNA e desenhadas de acordo com o seu alvo, sendo, portanto, uma opção de alto custo. Para o sistema SYBR Green, por se anelar a qualquer dupla fita, se faz necessária a construção de uma curva chamada de *Curva de Dissociação* (Figura 4.b) para que sejam evitados resultados falsos ou super estimados, visto que é possível a ocorrência de dímeros de *primers* (anelamento entre *primers*).

Como resultados obtêm-se as curvas mostradas na Figura 5, onde cada uma das linhas coloridas representa a reação de uma amostra.

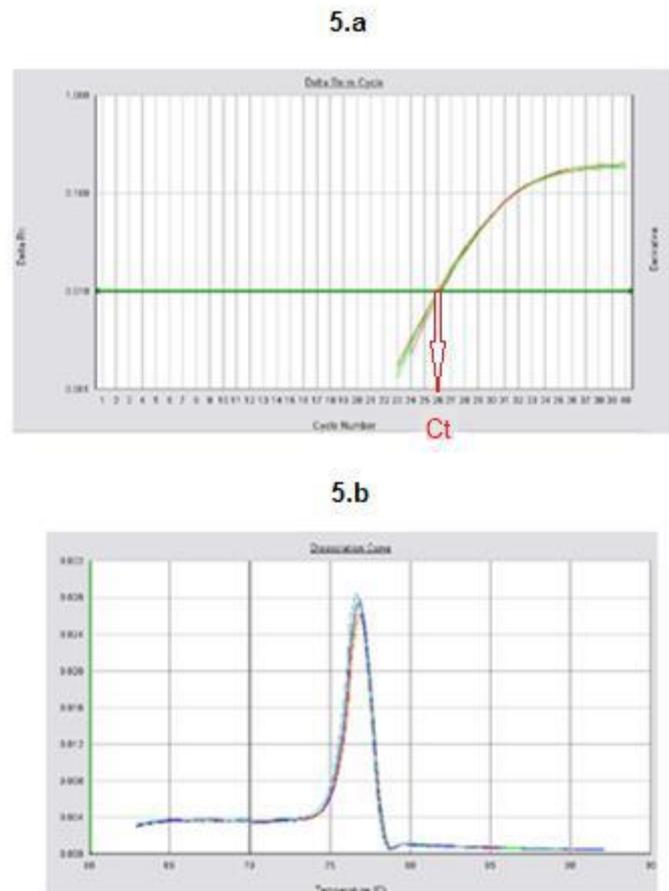


Figura 5. Exemplo de curva de amplificação por PCR em tempo real (a) e curva de dissociação (b) (http://www.dnabrasil.ind.br/pcr_express.html)

Um parâmetro muito utilizado em análises baseadas em PCR em tempo real é o Ciclo de *Threshold*, ou C_t , obtido a partir da curva de amplificação resultante da reação. A linha verde mostrada na figura 5.a é chamada de linha de *Threshold*, enquanto a interseção entre a curva de amplificação e a linha de *Threshold* é o C_t , que é uma medida relativa à concentração do alvo e corresponde ao número de ciclos da reação que foram necessários para a detecção, pelo equipamento, da fluorescência emitida pelos produtos da reação (Application Note: Real-time PCR, www.lifetechnologies.com).

Outra informação muito importante que pode ser obtida a partir da curva de dissociação é a temperatura de *melting* (T_m), definida como a temperatura na qual metade das fitas de DNA está na conformação de dupla-hélice enquanto a outra metade se encontra como fita simples. O conteúdo das bases nitrogenadas

citossina e guanina é o fator de maior influência sobre a T_m de um produto de PCR, responsável por provocar seu aumento, devido à ligação tripla estabelecida entre elas.

A importância desse parâmetro é justificada já que, a partir dela, pode-se julgar a especificidade de um determinado *primer*. Produtos de PCR resultantes de um determinado par de *primer* apresentam sempre a mesma T_m , senão muito próximas, caso contrário, a reação não foi específica.

4. Uso de ferramentas da bioinformática na construção de oligonucleotídeos iniciadores para detecção de sequências específicas de DNA

A bioinformática é uma ferramenta relacionada à área da ciência da computação e é responsável pelo suporte necessário para a análise de genomas (Breu *et al.*, 1998). A base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) assim como os programas *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e *FastPCR* (Kalendar, Lee & Schulman, 2011), são frequentemente utilizados para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). O genoma da espécie que se deseja analisar pode ser obtido na base de dados do NCBI e comparado com inúmeros outros genomas, através de programas como o *ClustalW*, para que se possa conhecer a melhor região do genoma para se construir o *primer*. Com o *FastPCR*, por exemplo, é possível a simulação de uma reação de PCR (PCR *in silico*) utilizando-se o *primer* recém-desenhado para avaliar sua especificidade.

Como para o sucesso de uma reação de PCR é imprescindível a utilização de *primers* específicos, podemos dizer que a bioinformática é uma ferramenta de fundamental importância.

Nesse trabalho utilizou-se a base de dados do NCBI além dos programas *GeneFisher* (Giegerich *et al.*, 1996) e *FastPCR* para o desenho de *primer* específico para a detecção de azeitona e teste do mesmo através de PCR *in silico*.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

A. Amostras

Foram utilizadas amostras de soja e azeitona *in natura*, além de óleo refinado de soja e azeite de oliva extra-virgem, obtidos no comércio local e de marcas de grande importância comercial, de acordo com sua disponibilidade em mercados varejistas da cidade do Rio de Janeiro..

Amostras adulteradas intencionalmente foram preparadas misturando-se diferentes percentuais de óleo refinado de soja em azeite de oliva extra-virgem, nas proporções de 0,5; 1; 5; 10 e 20%. O volume correspondente de óleo refinado de soja foi adicionado ao azeite de oliva extra-virgem e homogeneizado por 30 minutos sob agitação constante.

B. Análise por cromatografia gasosa de alta resolução

1. Saponificação

Foram pesados 0,25 g de amostra em erlenmeyer de boca esmerilhada de 125 mL que foi solubilizado em 9 mL de etanol aquecido (40°C) e adicionou-se 0,5 mL solução de padrões internos contendo 5-colesten-3-β-ol-7-ona (40 µg/mL), 0,5 mL de 5-α-colestanol (100 µg/mL) e 0,5 mL de solução saturada de KOH. Os frascos foram fechados em N₂ e a reação de saponificação ocorreu por 16 horas, a 36 °C e no escuro.

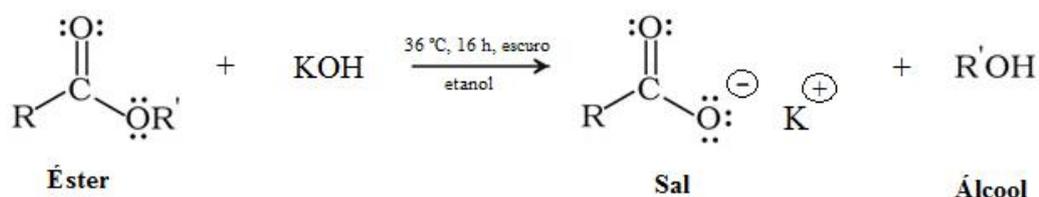


Figura 6. Esquema da reação de saponificação dos fitoesteróis

Após a saponificação, a mistura foi diluída com 10 mL de água destilada e adicionou-se 15 mL de éter dietílico para extrair os lipídeos insaponificáveis. A

mistura foi agitada e, após a formação das fases, retirou-se a fase aquosa. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, juntando os extratos em funil de separação de 125 mL.

Os extratos combinados foram lavados com 20 mL de solução aquosa de KOH (0,5 M), descartando-se a fase orgânica. Em seguida, os extratos foram lavados duas vezes com 20 mL de solução aquosa de Na₂SO₄, uma vez com 20 mL de água destilada, recolhidos em balão de evaporação de 250 mL e secos em rota- evaporador.

Ao resíduo formado no balão, adicionou-se 1,0 mL de etanol e secou-se novamente em rota- evaporador.

O novo resíduo foi então solubilizado em 4,0 mL (2 X 2,0 mL) de hexano:éter dietílico (9:1 v/v) e armazenado em frasco âmbar de 4 mL.

Todos os solventes utilizados, nessa etapa e nas próximas, apresentavam grau de pureza HPLC.

2. Purificação (extração em fase sólida – cartucho Si-SPE)

Os cartuchos de SPE (Bond Elut – Agilent Technologies) foram ativados com 5 mL de hexano e adicionou-se ao cartucho 1,0 mL de solução de resíduo lipídico obtido ao final da etapa de saponificação.

Lavou-se o cartucho com 5,0 mL de hexano:éter dietílico (9:1 v/v) para remover os compostos apolares, descartando a solução resultante, e lavou-se novamente o cartucho com 5,0 mL de hexano:éter dietílico (1:1 v/v) para remover os fitoesteróis não oxidados, recolhendo a solução resultante em tubo de vidro previamente lavado com ácido nítrico e adicionou-se a esse eluato 2,0 mL da solução padrão de colesterol. O solvente foi evaporado sob jato suave de N₂ e aquecimento (30°C). O resíduo foi ressuspensão em 3,0 mL de diclorometano:etanol (1:1 v/v) (3 X 1,0 mL, agitando em vortex antes de transferir para o frasco âmbar onde foi armazenado).

Os fitoesteróis oxidados foram eluídos com 5,0 mL de acetona e recolhidos em tubo de vidro lavado com ácido nítrico. Adicionou-se ao eluato 2,0 mL da solução de padrão de colestanol. O solvente foi evaporado sob jato suave de N₂ e aquecimento (30°C) e ressuspensão em 3,0 mL de diclorometano:metanol (1:1 v/v) (3 X 1,0 mL, agitando em vortex antes de transferir para o frasco âmbar onde foi armazenado).

3. Sililação

A etapa de derivatização das frações de fitoesteróis foi realizada através de duas metodologias que diferem entre si em relação ao tempo de reação e na utilização ou não de piridina. Em todos os casos foram utilizados tubos de vidro previamente lavados com ácido nítrico.

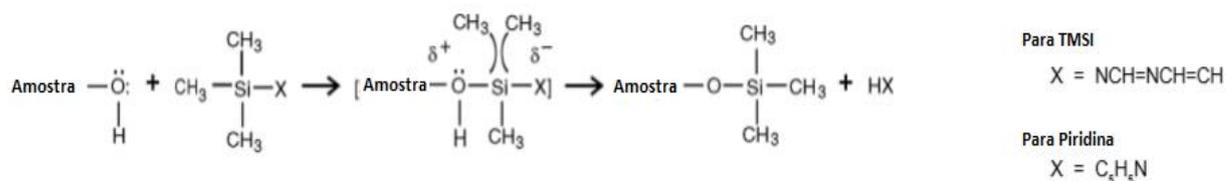


Figura 7. Esquema da reação de sililação, aplicada na derivatização dos fitoesteróis para análise por cromatografia em fase gasosa (TMSI+Pyridine Product Specification – Supelco/Sigma-Aldrich Co., 1997)

O primeiro protocolo (derivatização 1) foi testado transferindo-se para tubo de vidro 500 µL do extrato de fitoesteróis oxidados, 50 µL dos não-oxidados e secando-os completamente sob jato suave de N₂ e aquecimento (30 °C). A cada um dos extratos secos, adicionou-se 100 µL de N,O – bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (reagente de sililação), agitou-se os tubos para homogeneização da solução e deixou-se reagir por 6 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, evaporou-se o reagente sob jato suave de N₂ e aquecimento (30°C) e os produtos foram solubilizados em 200 µL de hexano.

O segundo procedimento (derivatização 2) foi testado transferindo-se para tubo de vidro 500 µL do extrato de fitoesteróis e adicionou-se 200 µL do reagente de sililação e 200 µL de piridina, agitou-se os tubos para homogeneização da solução e deixou-se reagir durante 30 minutos a 60 °C. Em seguida, evaporou-se o reagente sob jato suave de N₂ e aquecimento (60°C) e os produtos foram solubilizados em 50 µL de isopropanol.

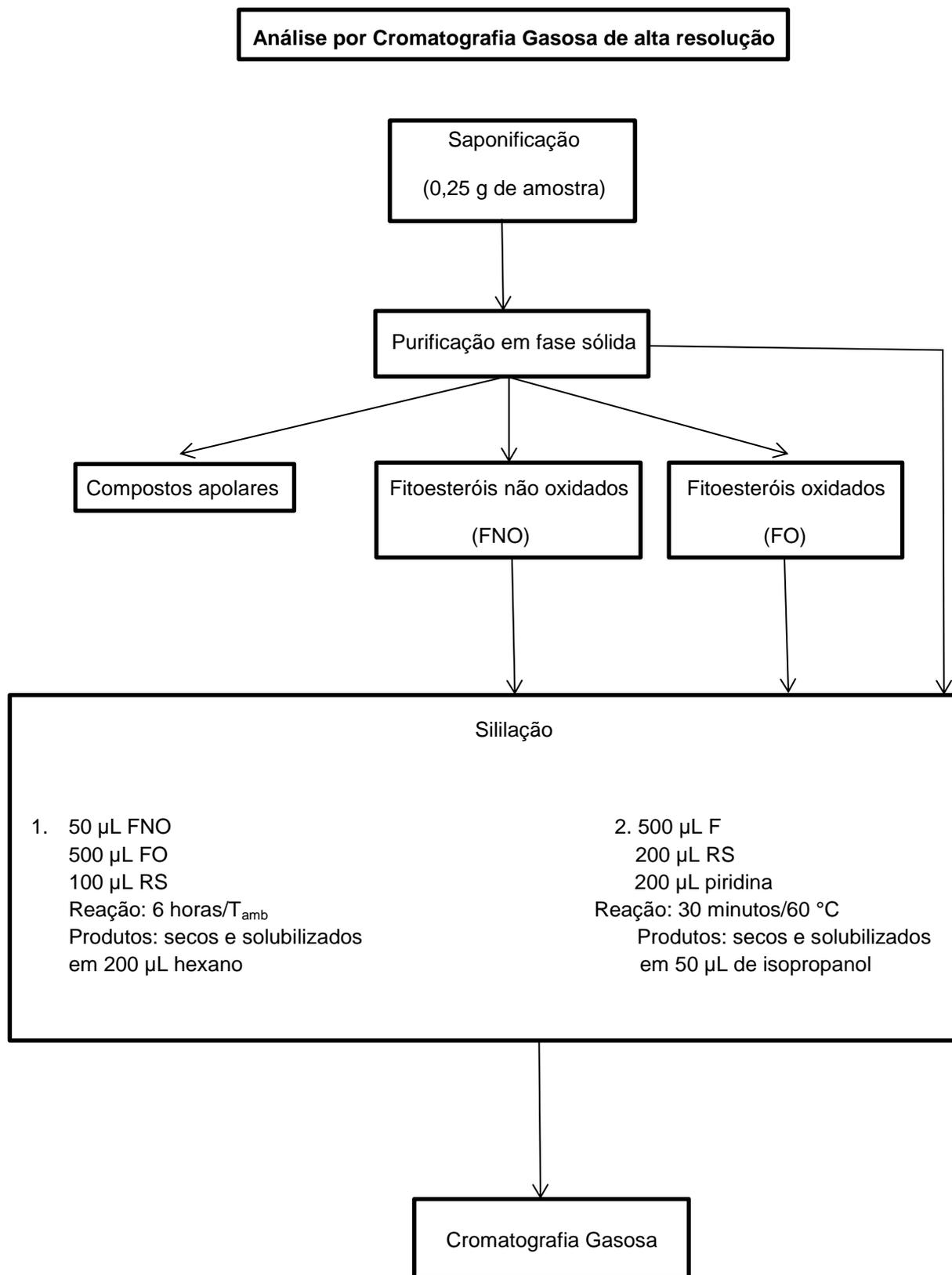


Figura 8. Diagrama ilustrando as principais etapas de processamento e análise dos fitoesteróis por Cromatografia Gasosa de alta resolução (F = fitoesteróis totais, RS = reagente de silylação, T_{amb} = temperatura ambiente)

4. Cromatografia gasosa de alta resolução

A cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo Shimadzu, modelo GC-14B e GC-2010, detector de ionização de chama (FID), injetor do tipo *splitless* e PTV/*splitless*, respectivamente, e coluna capilar de sílica fundida (Quadrex 007-5; 5% fenil-metilpolisiloxano) de 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,32 mm e espessura do filme 0,25 μm .

Primeiramente as análises foram realizadas no equipamento Shimadzu GC-14B, com alguns parâmetros fixos e outros variando, de forma a se obter uma melhor condição de análise. Os parâmetros utilizados foram: hélio como gás de arraste e *make-up*, com velocidade linear do gás de arraste ajustada em 25 cm/s, vazão do gás (He) na saída do divisor igual a 40 ou 60 mL/minuto, temperatura do detector e injetor iguais a 300 e 275 °C, respectivamente, injeção do tipo *splitless* pelo período de 2 ou 3 minutos e programação da coluna: temperatura inicial de 40 °C por 2 ou 3 minutos, 10 ou 30 °C/minuto até 200 ou 250 °C e 2 ou 3 °C/minuto até 260 ou 275 °C por 40,45 ou 60 minutos. Essas condições são mostradas na tabela abaixo.

Tabela 1. Condições das injeções realizadas no cromatógrafo Shimadzu GC-14B

Injeção	Amostra	Vazão de He [mL/min] na saída do divisor	Período de splitless [minutos]	Gradiente de temperatura da coluna
1	óleo de soja, fração não oxidada	60	2	40 °C (2') + 10 °C/min até 200 °C + 3 °C/min até 275 °C (40')
2	óleo de soja, fração oxidada	40	3	40 °C (2') + 10 °C/min até 200 °C + 2 °C/min até 260 °C (40')
3	óleo de soja, fração não oxidada	40	3	40 °C (3') + 30 °C/min até 250 °C + 3 °C/min até 275 °C (45')
4	óleo de soja, fração não oxidada	40	3	40 °C (3') + 30 °C/min até 250 °C + 3 °C/min até 275 °C (60')
5	óleo de soja, fração oxidada	40	3	40 °C (3') + 30 °C/min até 250 °C + 3 °C/min até 275 °C (60')

Como não se obteve uma condição ótima de análise, passou-se a utilizar o cromatógrafo Shimadzu GC-2010, equipado com injetor do tipo PTV (*Programmed Temperature Vaporization*) e os parâmetros aplicados foram: hélio como gás de arraste e *make-up*, velocidade linear do gás de arraste ajustada em 25 cm/s, vazão do gás (He) igual a 3 mL/minuto, temperatura do detetor igual a 300 °C e do injetor PTV a temperatura foi de 40 °C durante 1 minuto aumentando até 300 °C, injeção do tipo *splitless* e programação da coluna: temperatura inicial de 260 °C por 1 minuto, 1 °C/minuto até 290 °C por 10 minutos. Em seguida, a programação do injetor PTV foi

alterada, pois sua estabilização de temperatura entre corridas cromatográficas não estava adequada. Os parâmetros alterados foram: injetor PTV com temperatura inicial de 70 °C durante 1 minuto aumentando 70 °C/minuto até a temperatura final de 280 °C e programação da coluna: temperatura inicial de 260 °C por 1 minuto, 1 °C/minuto até 290 °C por 10 minutos.

O volume de amostra injetado foi 1 µL em todos os casos.

C. Análise por PCR em tempo real

1. Extração de DNA genômico

A extração de DNA é uma etapa muito importante, pois o sucesso de todas as análises seguintes depende da qualidade e quantidade do DNA obtido nessa fase. Considerando que em óleos vegetais, devido ao seu processamento, o DNA se encontra degradado e em baixas concentrações, a extração de DNA de amostras desse tipo torna-se ainda mais desafiadora. Diferentes métodos de extração de DNA foram testados, sendo alguns deles kits comerciais e outros métodos *in house*, de forma a ser possível a escolha daquele que demonstrasse maior eficiência em relação a pureza, capacidade de amplificação e quantidade de DNA recuperado. Os métodos testados foram: DNeasy *mericon* Food kit (Qiagen), DNA Extractor kit (Eurofins), CTAB-hexano-clorofórmio (Giménez *et al.*, 2010) e CTAB-hexano-clorofórmio seguido das etapas de purificação do kit DNeasy Plant (Giménez *et al.*, 2010 e DNeasy Plant - Qiagen). Os protocolos seguidos para cada um dos métodos encontram-se em anexo.

2. Reação de PCR-RAPD

A reação de PCR-RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) foi realizada com o objetivo de avaliar a qualidade do DNA obtido a partir de cada um dos métodos de extração e se deu em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystem*. Os reagentes foram tampão PCR 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), MgCl₂ 3,5 mM, desoxinucleotídeos (dNTPs) 0,4 mM, oligonucleotídeos iniciadores (OPW 15 – Eurofins MWG Operon) 0,2 µM, *Taq DNA polimerase recombinante* 0,15 U/µL (*Invitrogen Life Technologies*). O volume final da reação foi

de 50 µL, sendo 47 µL de mix e 3,0 µL de DNA molde. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 37 °C por 30 segundos, polimerização a 72 °C por 1 minuto, extensão final a 72 °C por 5 minutos e resfriamento a 4 °C.

3. Eletroforese em gel de agarose

Através da técnica de eletroforese em gel de agarose foi possível analisar os resultados da reação de PCR-RAPD em relação a capacidade de amplificação do DNA obtido através de cada um dos métodos de extração testados.

Em gel de agarose 2,0% (p/v) com brometo de etídio (protocolo de preparo do gel em anexo) foram aplicados os produtos da PCR-RAPD misturados ao azul de bromofenol (tampão corante). A corrida eletroforética foi realizada nas seguintes condições: 150 V, 150 mA durante 180 minutos em aparelho *APELEX MAXIGEL ECO 2*, a visualização do gel foi realizada através do transiluminador modelo ECX-20M sob luz UV e fotodocumentação através do sistema de documentação digital (*Vilber Lourmat*) acoplado ao transiluminador.

4. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados

Um par de oligonucleotídeos iniciadores específico para azeitona (*Olea93*), fruto das oliveiras (*Olea europaea*), foi sintetizado baseado no gene *Olea europaea cicloartenol sintase* (AY847065.1). A sequência de nucleotídeos, obtida no banco de dados disponibilizado na internet do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foi analisada através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) em relação a sua similaridade com outras sequências. O *primer* foi desenhado utilizando-se o programa Genefisher e testado por PCR *in silico* através do programa FastPCR.

O par de oligonucleotídeo iniciador específico para a lectina (*Lec77*), proteína da soja, foi validado em estudo realizado por He *et al.*, 2013.

Os dois pares de *primers* foram sintetizados pela Biosearch Technologies (Petaluma, CA).

5. PCR em tempo real

Primeiramente, a reação foi realizada utilizando-se DNA extraído a partir de azeitonas e soja com o objetivo de avaliar a especificidade dos *primers* escolhidos (reação 1) e, posteriormente, essa técnica foi aplicada para a análise da sua capacidade em detectar a presença de óleo de soja em azeite de oliva extra-virgem adulterados intencionalmente nas proporções de 0, 0,5, 1, 5, 10 e 20% com o óleo de soja (reação 2).

O equipamento utilizado foi o ABIPRISM 7000 Sequence Detection System *Applied Biosystem* e os reagentes foram 25 µL de SYBRGreen Master Mix (*Applied Biosystems*), 1,2 µL de cada primer, 18,6 µL de água milli-Q e 4,0 µL de DNA (reação 1) e 25 µL de SYBRGreen Master Mix (*Applied Biosystems*), 1,2 µL de cada primer e 22,6 µL de DNA (reação 2). O volume final da reação foi de 50 µL, sendo 46 µL de mix e 4,0 µL de DNA molde (reação 1) e 27,4 µL de mix e 22,6 µL de DNA molde (reação 2). As condições da reação foram: 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Uma curva de dissociação também foi incluída já que trabalhou-se com o sistema SYBR Green.

Foram confeccionadas duas curvas-padrão: a primeira, através da reação de DNA de azeitona concentrado e diluído (5, 10, 50 e 100X) com o primer Olea93 e, na segunda, DNA de soja concentrado e diluído (5, 10, 50 e 100X) com o primer Lec77. Os resultados obtidos pela construção das curvas-padrão foram utilizados para a determinação dos limites de detecção e quantificação do método, além do cálculo da eficiência das reações.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. Análise por cromatografia gasosa de alta resolução

As condições de cada uma das cinco injeções realizadas no equipamento Shimadzu GC-14B (cromatogramas parciais em anexo) foram mostradas anteriormente na tabela 1.

A primeira temperatura de 40 °C foi mantida em todas as corridas como estratégia para que não fosse observada uma frente de solvente muito larga, capaz

de comprometer a visualização do pico de algum possível componente de baixo tempo de retenção.

Analisando-se os cromatogramas obtidos, temos que apenas em um deles (cromatograma 2), referente a fração oxidada dos fitoesteróis da amostra de óleo de soja, foi possível a visualização de picos bem definidos. Nos outros cromatogramas não foi possível a visualização de picos referentes aos padrões e aos componentes da amostra.

No cromatograma 2, os padrões/componentes eluídos apresentaram tempos de retenção muito altos (a partir de 60 minutos), quando a temperatura da coluna era de 260 °C. Visto isso, foi feita uma programação de aumento de temperatura mais intenso de modo que temperaturas maiores fossem atingidas em um tempo menor. Porém, essa expectativa não foi confirmada nos cromatogramas que se seguiram. Os mesmos apresentaram um aumento na linha de base bastante acentuado causado pelo intenso aumento de temperatura, necessária para a eluição dos padrões/componentes esperados.

Em relação à reação de silição, quatro metodologias foram utilizadas e encontram-se resumidas na tabela abaixo:

Tabela 2. Metodologias testadas para a etapa de derivatização (FO = fração oxidada, FNO = fração não-oxidada, I = hexano, II = isopropanol, T_{amb} = temperatura ambiente e * = extrato seco)

	1	2	3	4
Extrato de fitoesterol [μL]	500 FO* e 50 FNO*	500*	500	500
Reagente de sililação [μL]	100	100	200	200
Piridina [μL]	-	100	200	200
Tempo de reação [horas]	6	16	0,5	0,5
Temperatura da reação [°C]	T _{amb}	T _{amb}	60	60
Tipo do Solvente	I	I	I	II
Volume final de solvente [μL]	200	200	200	50

A primeira alteração que pode ser observada é a etapa de separação das frações oxidadas e não-oxidadas que foi realizada apenas na primeira metodologia testada, pois foi considerado que essa separação não influenciaria nos picos cromatográficos uma vez diferenças entre essas duas frações não estavam no âmbito desse trabalho.

Nas metodologias 3 e 4, o volume do reagente de sililação (N,O – bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano) foi o dobro do utilizado em 1 e 2 pois, nas duas primeiras metodologias o extrato de fitoesteróis estava seco quando esse reagente era adicionado, enquanto que em 3 e 4 não, logo a adição de um maior volume de reagente se fez necessário.

Outra mudança observada é o uso da piridina como solvente da reação de derivatização. A ausência desse solvente poderia estar interferindo na reação de

derivatização e, conseqüentemente, atrapalhando a visualização dos picos cromatográficos. Passou-se então a utilizá-la em duas condições diferentes: 100 µL deixando-se a reação durante a noite à temperatura ambiente e 200 µL com tempo de reação de 30 minutos/60 °C. O volume de solvente também foi alterado de 200 para 50 µL com o objetivo de diminuir a diluição dos fitoesteróis extraídos.

As condições de reação foram ajustadas de forma a se obter o mesmo resultado, porém em um intervalo de tempo muito menor do que o proposto inicialmente, através do aquecimento (60 °C) dos tubos de reação.

A mudança do solvente hexano para o isopropanol foi necessária pois, um dos padrões que iria ser utilizado (campesterol) não foi solúvel em hexano, então, para que todos os padrões e amostras estivessem sob as mesmas condições de análise, o hexano foi trocado pelo isopropanol. O volume final do solvente utilizado também foi alterado com o objetivo de concentração do analito, já que os picos cromatográficos apresentaram-se pequenos ou não foi possível a visualização deles. Porém, com o volume de 50 µL de solvente, dificultou a solubilização dos produtos da reação de silição (“lavagem” do tubo de reação) para a retirada desses produtos do tubo e armazenagem em outro recipiente. Dessa forma, uma parte dos produtos formados provavelmente foi perdida.

Em seguida, as análises passaram a ser realizadas no cromatógrafo Shimadzu GC-2010, o qual possui injetor PTV. Essa mudança foi proposta pois, talvez, com a programação de temperatura do injetor, a frente do solvente poderia diminuir, evitando que picos referentes aos padrões ou aos fitoesteróis das amostras fossem mascarados.

Outra alteração foi que, as amostras injetadas nesse segundo momento não passaram pela etapa de purificação, onde eram separadas as frações de fitoesteróis oxidados e não-oxidados. Essa etapa não foi mais realizada pois, a diferença entre essa duas frações não fazia parte do objetivo desse trabalho.

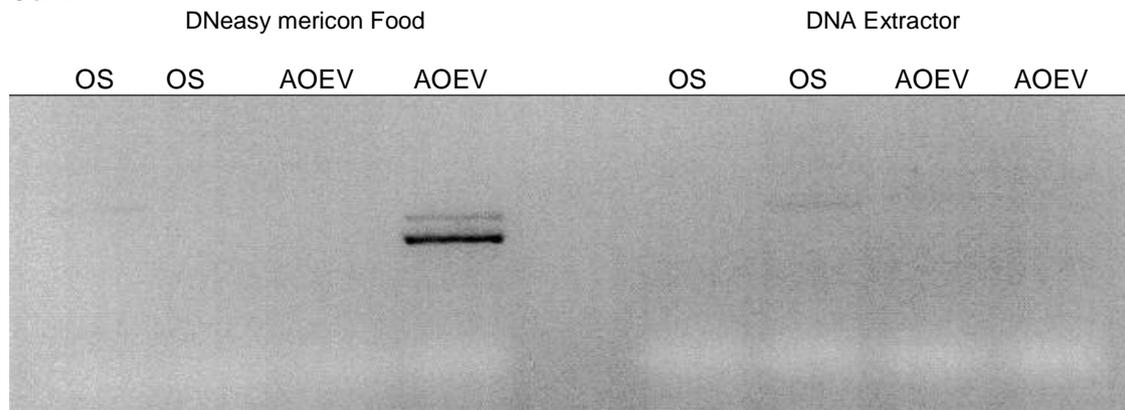
Os cromatogramas obtidos após essas mudanças encontram-se em anexo com suas respectivas condições de análise.

B. Análise por PCR em tempo real

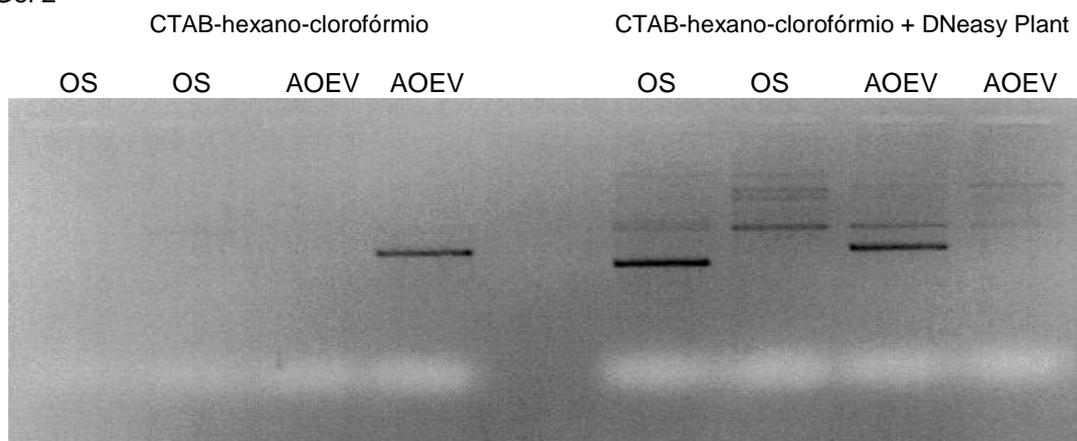
1. Seleção do melhor método de extração de DNA

Foram realizadas extrações de DNA através de quatro diferentes métodos DNeasy *mericon* Food kit (Qiagen), DNA Extractor kit (Eurofins), CTAB-hexano-clorofórmio (Giménez, M. J., *et al.* 2010) e CTAB-hexano-clorofórmio + DNeasy Plant (Giménez, M. J., *et al.* 2010 + DNeasy Plant - Qiagen)). Os extratos obtidos foram submetidos à reação de PCR-RAPD com *primer* OPW15. O gel de agarose é mostrado na Figura 5.

Gel 1



Gel 2



Gel 3

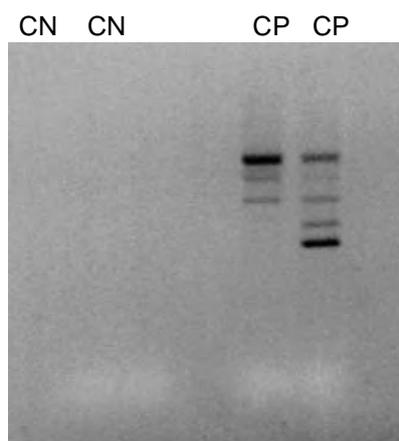


Figura 9. Perfil de fragmentos amplificados por PCR-RAPD a partir de diferentes métodos de extração de DNA (gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio, condições da corrida eletroforética: 150 mV/150 A). OS = óleo de soja, AOEV = azeite de oliva extra-virgem, CN = controle negativo da reação (água milliQ) e CP = controle positivo da reação (DNA genômico de soja).

Através desses resultados pode-se concluir que o método de extração de DNA que apresentou o melhor resultado foi o CTAB-hexano-clorofórmio seguido das etapas de purificação do kit DNeasy Plant, pois foi através dele que se obteve um extrato de DNA amplificável e, conseqüentemente, de qualidade suficiente para ser submetido a análise de PCR em tempo real. Além disso, o novo método proposto apresenta ainda a vantagem de ser mais rápido (duração total de 3-4 horas) em relação ao CTAB-hexano-clorofórmio que apresenta uma etapa durante a noite.

A quantificação do DNA extraído foi realizada no equipamento Qubit fluorometer – Invitrogen, e as concentrações são mostradas na tabela abaixo.

Tabela 3. Concentração de DNA de azeitona, soja, azeite de oliva extra-virgem e óleo de soja

Matriz	Concentração média de DNA [$\mu\text{g/mL}$]
Azeitona	1,85
Soja	21,24
Azeite de oliva extra-virgem	não detectado
Óleo de soja	não detectado

Não foi possível obter as concentrações de DNA das amostras de azeite de oliva extra-virgem e de óleo de soja, pois apresentaram-se abaixo do limite de quantificação do equipamento utilizado. Porém, não significa que a extração de DNA não foi bem sucedida já que os extratos de DNA das duas amostras mostraram capacidade de amplificação quando submetidos à reação de PCR-RAPD.

2. PCR em tempo real

2.1. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados

As sequências específicas dos dois pares de *primers* utilizados são mostradas na tabela abaixo:

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real

	Olea93	Lec77
Sequência (Forward)	5' GTGCTCTCAAAGGGTCA 3'	5' TCGCCGCTTCCTTCAACTT 3'
Sequência (Reverse)	5' GGATGCTGTAGCATGACA 3'	5' GCCCATCTGCAAGCCTTTT 3'

Os *primers* foram testados através de PCR *in silico* através do programa FastPCR e o resultado foi o seguinte:

```
Sequences: 1: 2178 | Pre-designed primers list 2: 36 | In silico PCR Result
In silico Primer(s) search for: gi|61654882|gb|ay847065.1| olea europaea cycloartenol synthase gene, partial cds
1f1 5'-gtgctctctcaaaagggtca
Position: 164->181 100% Tm = 51,9°C
5-gtgctctctcaaaagggtca->
|||||
aggtgctctctcaaaagggtcaagta
2r2 5'-ggatgctgtagcatgaca
Position: 239<-256 100% Tm = 50,5°C
<-acagtacgatgtcgtagg-5
|||||
agtgtcatgctacagcatccgaga
>1f1 164->181
5'-gtgctctctcaaaagggtca
>2r2 239<-256
5'-ggatgctgtagcatgaca
PCR product size: 93bp Ta=58°C
```

Figura 10. Resultado da PCR *in silico* para o par de *primers* Olea93: 100% de anelamento entre os *primers* e o respectivo DNA molde

```
Sequences: 1: 1333 | Pre-designed primers list 2: 38 | In silico PCR Result
In silico Primer(s) search for: gi|353336049:1124292-1125624 glycine max cultivar williams 82 chromosome 2, v1.1, whole genome
shotgun sequence
1f1 5'-tcgocgcttccttcaactt
Position: 494->512 100% Tm = 56,9°C
5-tcgocgcttccttcaactt->
|||||
cttcgocgcttccttcaacttcaacc
2r2 5'-gcccatctgcaagcctttt
Position: 535<-553 100% Tm = 54,6°C
<-ttttccgaaagcttatcccg-5
|||||
caaaaaggcttcagatgggcttgc
>1f1 494->512
5'-tcgocgcttccttcaactt
>2r2 535<-553
5'-gcccatctgcaagcctttt
PCR product size: 60bp Ta=61°C
```

Figura 11. Resultado da PCR *in silico* para o par de *primers* Lec77 (He *et al.*, 2013): 100% de anelamento entre os *primers* e o respectivo DNA molde

a. Análise da especificidade dos *primers*

Foram realizadas extrações de DNA de azeitona e soja através do protocolo selecionado e os extratos de DNA obtidos foram diluídos (0, 5, 10, 50 e 100X) para serem submetidos a reações de PCR em tempo real com os *primers* Olea93 e Lec77. As curvas de dissociação obtidas são mostradas a seguir:

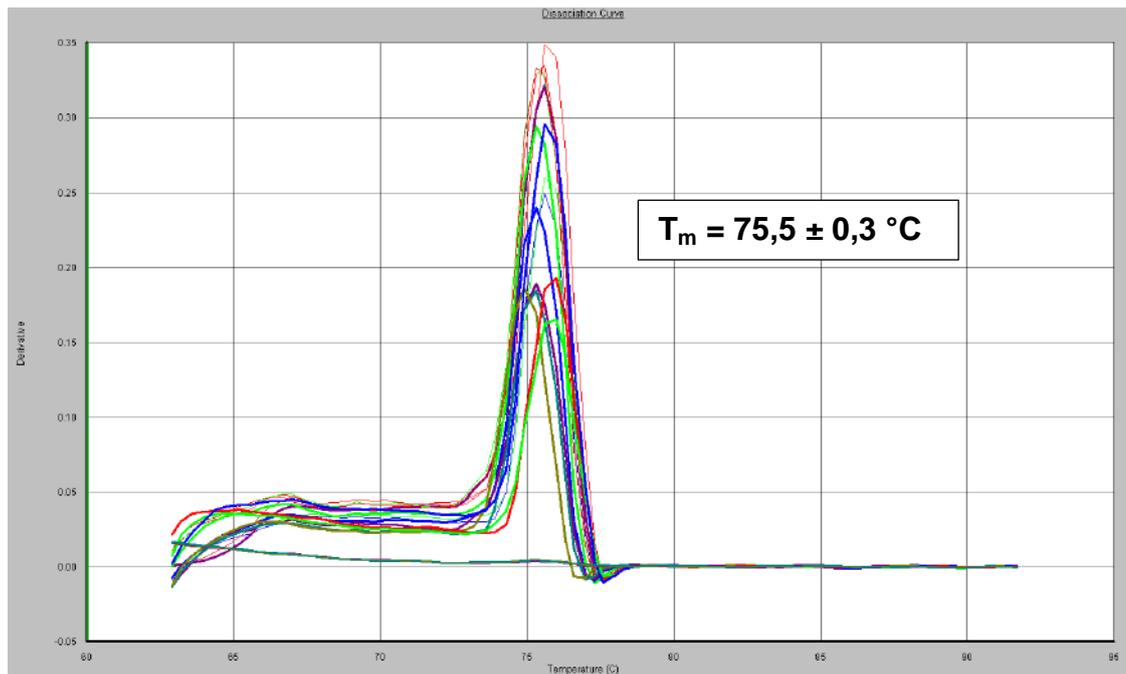


Figura 12. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de azeitona com o par de primers Olea93.

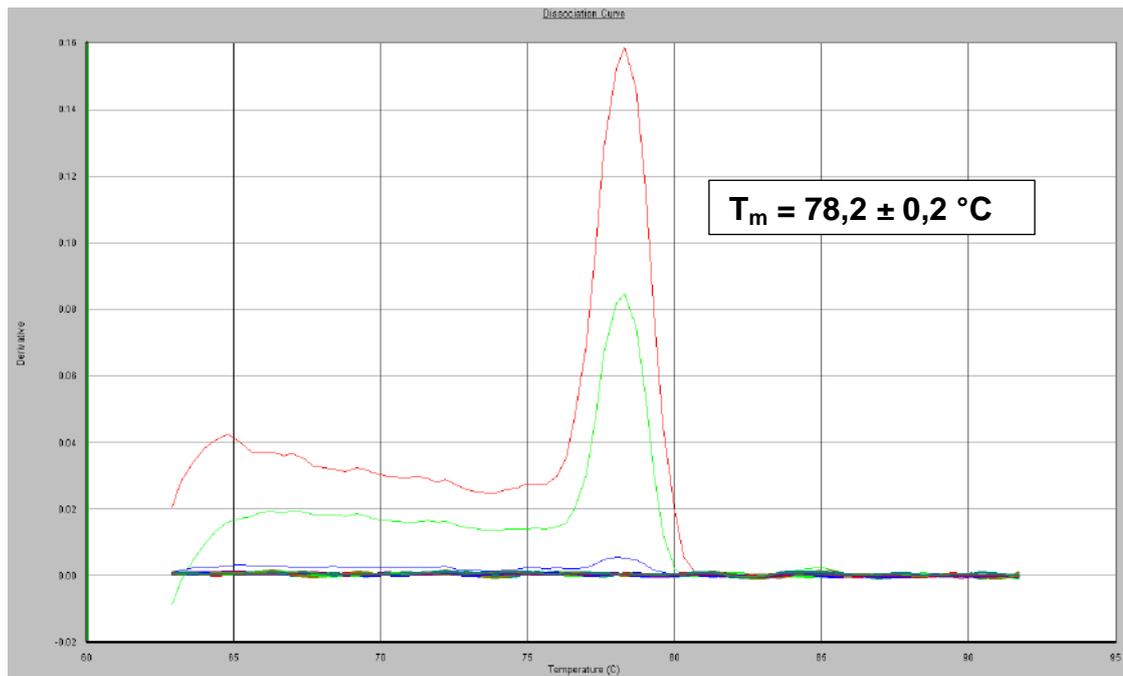


Figura 13. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de azeitona com o par de primers Lec77.

Com as figuras 12 e 13 pode-se analisar a especificidade dos *primers* Olea93 e Lec77 para a detecção de azeitona, pois elas mostram as curvas de dissociação obtidas para as reações de DNA de azeitona com esses *primers*, respectivamente. Através da análise dessas imagens pode-se concluir que o primer Olea93 demonstrou especificidade para a detecção de azeitona, com temperatura de *melting* igual a $75,5 \pm 0,3 \text{ } ^\circ\text{C}$, enquanto que na figura 9, referente a reação de DNA de azeitona com o primer Lec77, os picos apresentam $T_m = 78,2 \pm 0,2 \text{ } ^\circ\text{C}$, logo pode-se dizer que trata-se de picos não-específicos.

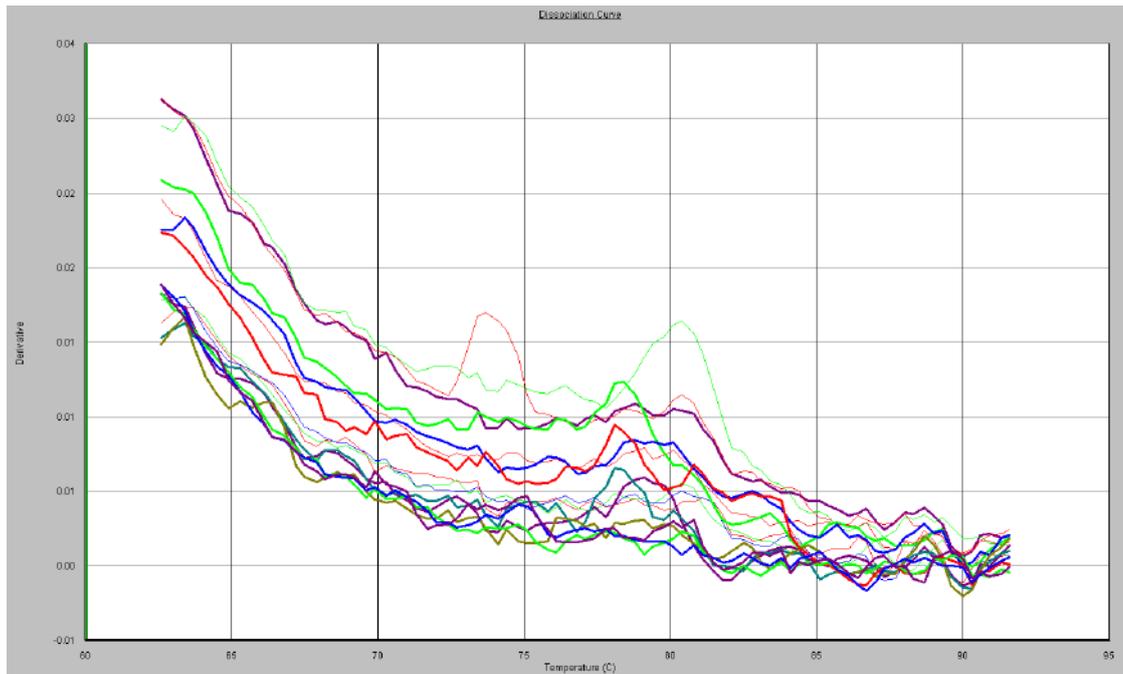


Figura 14. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de soja com o par de primers Olea93.

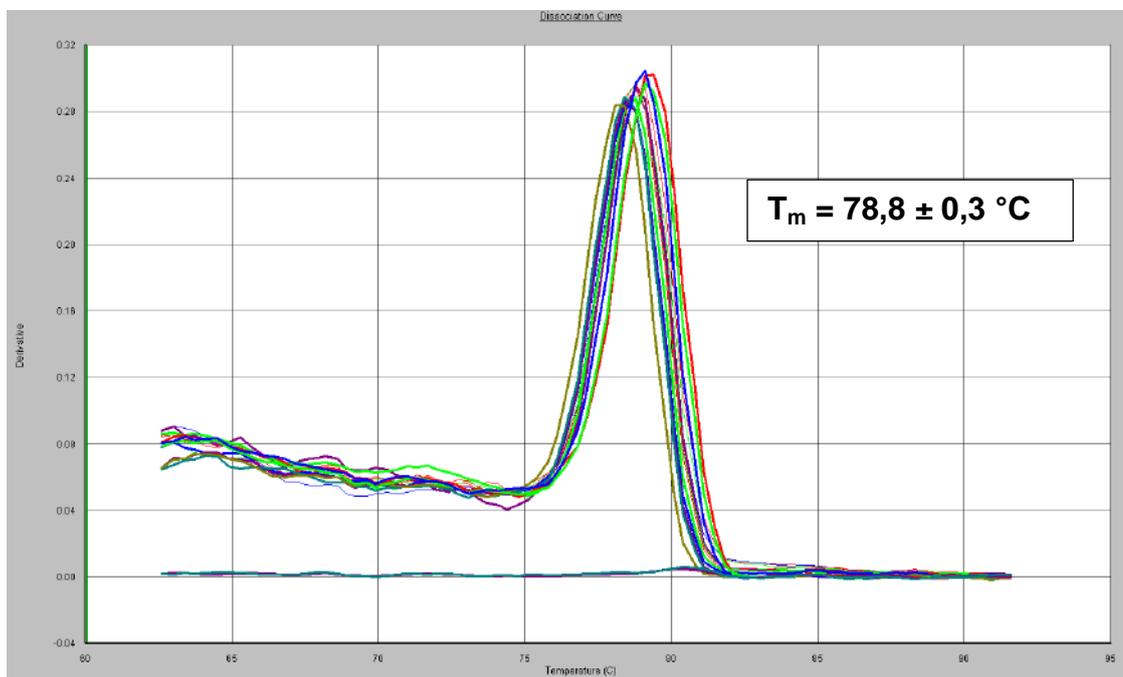


Figura 15. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de soja com o par de primers Lec77.

Com as figuras 14 e 15 pode-se analisar a especificidade dos *primers* Olea93 e Lec77 pois elas mostram as curvas de dissociação obtidas para as reações de DNA de soja com esses *primers*, respectivamente. Através da análise dessas imagens pode-se concluir que o *primer* Olea93 não mostrou amplificação com o DNA de soja, como era esperado, enquanto que o Lec77 demonstrou especificidade para a detecção de soja, com temperatura de *melting* igual a $78,8 \pm 0,3$ °C.

A partir dessas reações foram construídas curvas padrão que são apresentadas abaixo.

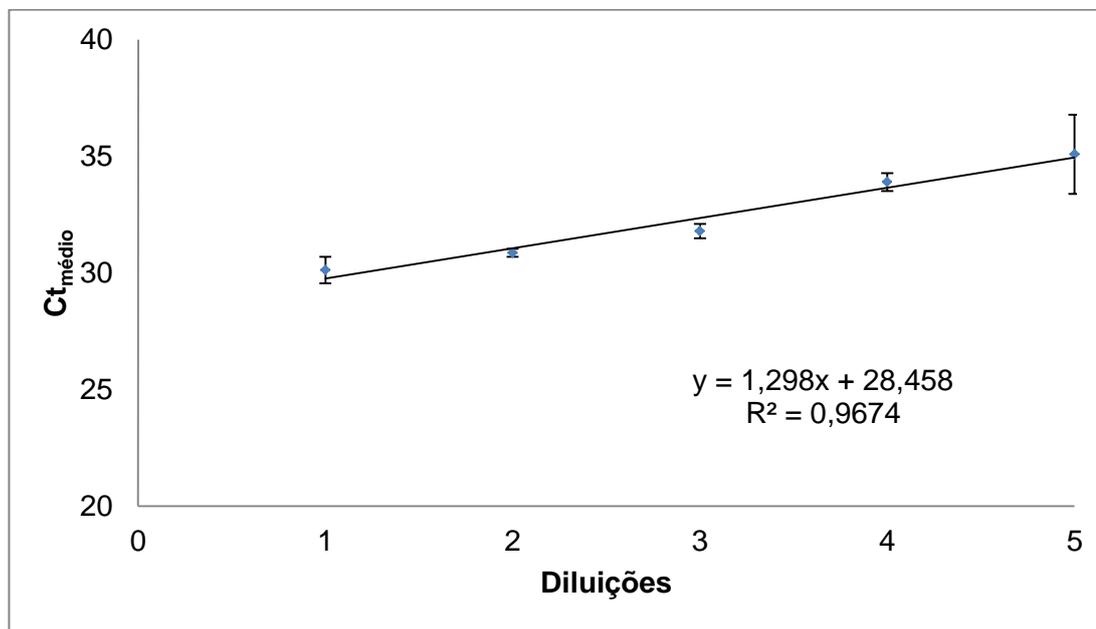


Figura 16. Curva padrão construída a partir de reação de PCR em tempo real de DNA de azeitona com o par de *primer* Olea93 (1=DNA de azeitona sem diluição, 2=DNA de azeitona 5X diluído, 3=DNA de azeitona 10X diluído, 4=DNA de azeitona 50X diluído e 5=DNA de azeitona 100X diluído).

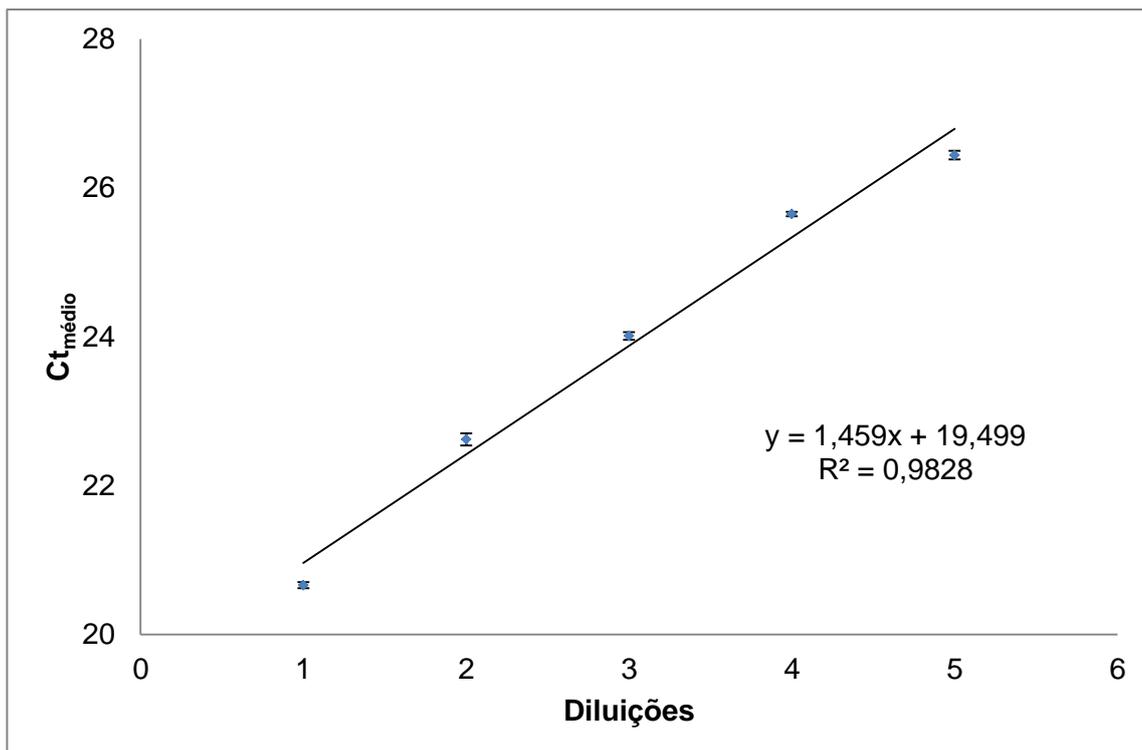


Figura 17. Curva padrão construída a partir de reação de PCR em tempo real de DNA de soja com o par de *primer* Lec77 (1=DNA de soja sem diluição, 2=DNA de soja 5X diluído, 3=DNA de soja 10X diluído, 4=DNA de soja 50X diluído e 5=DNA de soja 100X diluído).

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para os dois sistemas (Olea93 e Lec77) foram calculados e, de acordo com Ribeiro & Ferreira, 2008, LOD é a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica e LOQ é a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método.

O LOD foi calculado como sendo igual a três vezes o desvio padrão da amostra mais diluída enquanto o LOQ foi considerado igual ao dobro do LOD.

Nas tabelas abaixo encontram-se os resultados obtidos:

Tabela 5. Determinação dos limites de detecção e de quantificação para o *primer* Olea93

Maior diluição da amostra	Desvio Padrão	LOD [µg/mL]	LOQ [µg/mL]
100X	1,7	5,1	10,2

Tabela 6. Determinação dos limites de detecção e de quantificação para o primer Lec77

Maior diluição da amostra	Desvio Padrão	LOD [µg/mL]	LOQ [µg/mL]
100X	0,06	0,18	0,36

As eficiências dos primers Olea93 e Lec77 foram calculadas segundo a fórmula $10^{(-1/\text{coeficiente angular})} - 1$ e os valores encontrados foram:

Tabela 7. Eficiência dos primers Olea93 e Lec77

Primer	Coeficiente angular	Eficiência (%)
Olea93	1,2977	83
Lec77	1,4597	79

O DNA extraído de óleo de soja e azeite de oliva extra-virgem através do protocolo selecionado foi submetido a reação de PCR em tempo real e as curvas de dissociação obtidas foram:

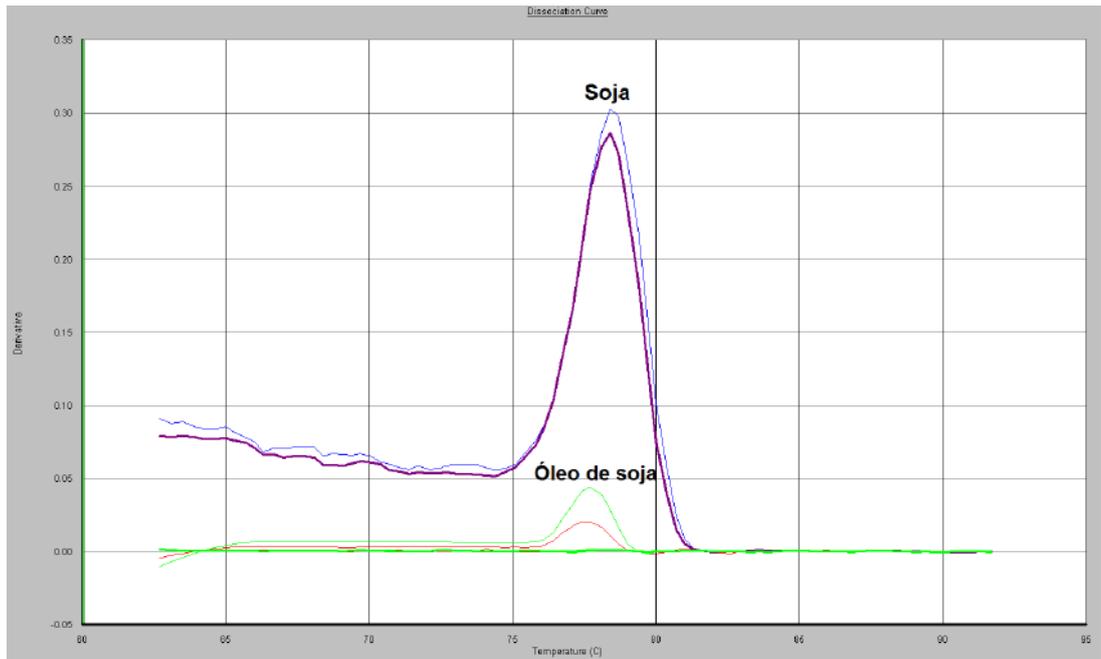


Figura 18. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de soja e óleo de soja com o par de primers Lec77.

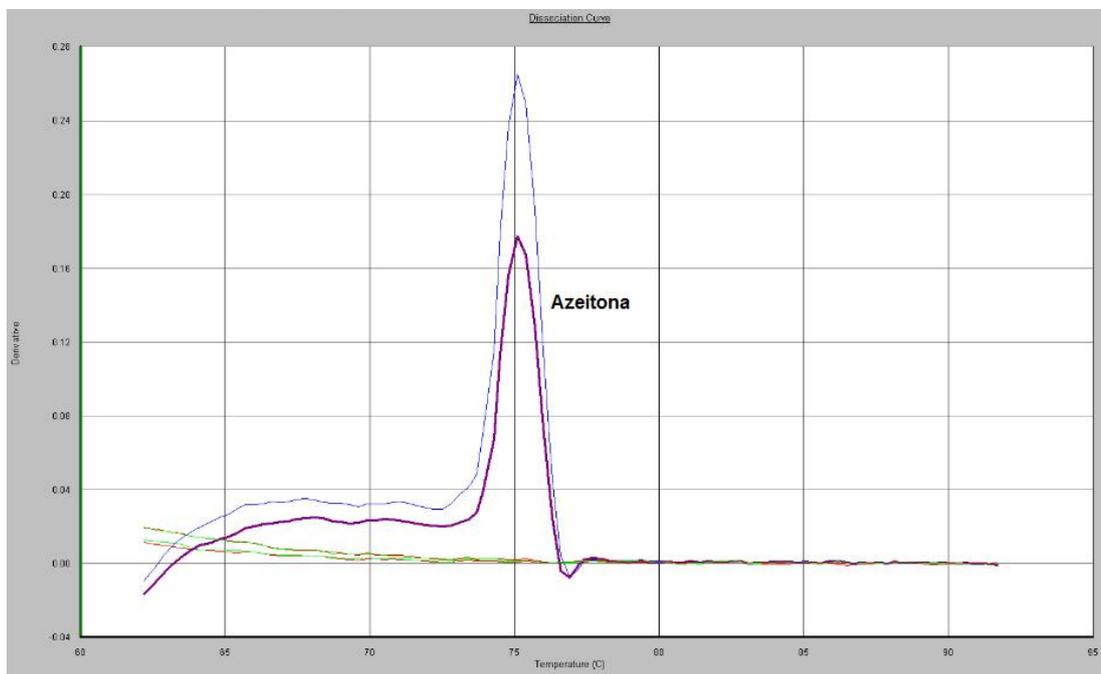


Figura 19. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA de azeitona e azeite de oliva extra-virgem com o par de primers Olea93.

Pela análise da figura 18, sabe-se que o *primer* Lec77 mostrou amplificação específica para o óleo de soja já que os seus picos na curva de dissociação foram na mesma temperatura que os picos da soja. Os picos referentes ao óleo de soja apresentaram, porém, intensidades menores que os referentes a soja, o que pode ser justificado pela grande degradação sofrida pelas moléculas de DNA durante o processamento pelo qual a soja é submetida durante a fabricação do seu óleo, além do extrato de DNA obtido da extração apresentar baixa concentração.

Já o *primer* Olea93 não mostrou amplificação para o azeite de oliva extra-virgem, mas apenas para a azeitona, como é mostrado na Figura 19. A razão pela qual esse comportamento foi verificado pode ser que o número de bases do fragmento (93) ainda seja grande, além da baixa concentração do extrato de DNA obtido.

2.2. Análise da técnica de PCR em tempo real em relação a sua capacidade em detectar a presença de óleo de soja em azeite de oliva extra-virgem adulterado intencionalmente

As adulterações intencionais com óleo de soja em azeite de oliva extra-virgem, nos percentuais 0, 0,5, 1, 5, 10 e 20%, foram submetidas a extração de DNA de acordo com o protocolo selecionado e, em seguida, submetidas a reação de PCR em tempo real.

O *primer* Lec77 não apresentou amplificação com essas amostras de adulterações intencionais, pois, além da degradação e baixa concentração de DNA, como mencionado anteriormente, tem-se também que, os extratos de DNA obtidos dessas amostras são uma mistura de DNA do azeite de oliva extra-virgem (maior parte) e do óleo de soja (menor parte). Através da Figura 18, observa-se que o pico referente a 100% de óleo de soja apresentou intensidade baixa, então, como agora o maior percentual que temos é de 20% de óleo de soja (5 vezes menos), o pico que deveria ser observado na curva de dissociação seria, aproximadamente, 5 vezes menor. Como o pico para 100% de óleo de soja já foi pequeno, o pico referente a 20% de óleo de soja seria menor ainda e, por isso, não foi observado.

A reação de PCR em tempo real foi repetida adicionando-se padrão interno: DNA de azeitona quando o *primer* Olea93 foi utilizado e DNA de soja quando *primer*

Lec77 foi utilizado. Nesse caso, a reação ocorreu, pois foi possível a observação dos picos através da curva de dissociação, como é mostrado na figura 20.

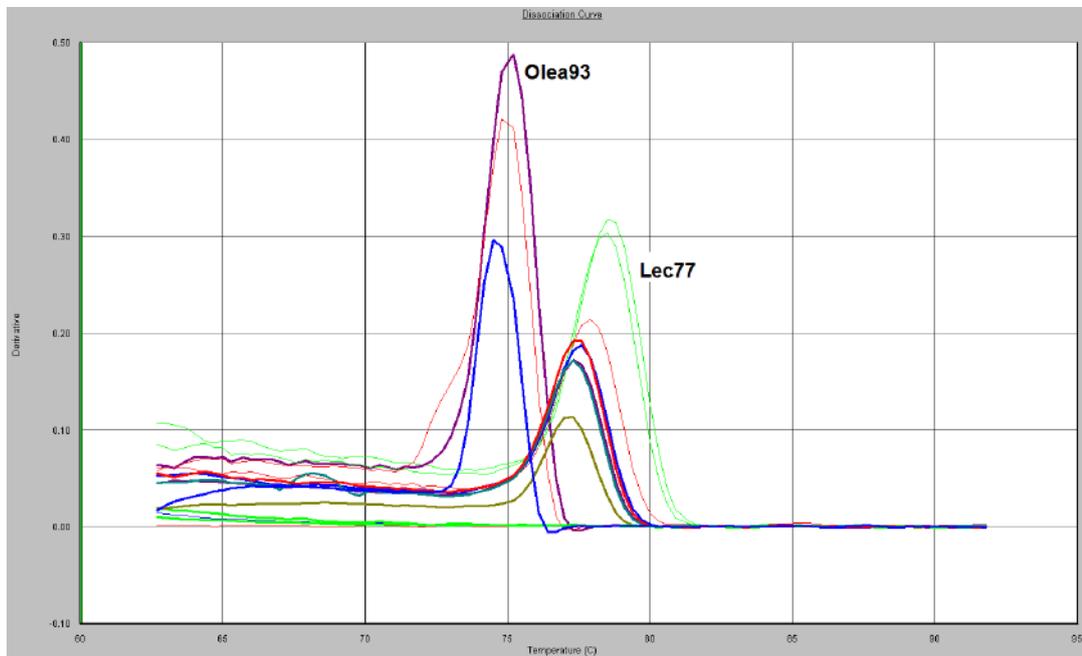


Figura 20. Curva de dissociação obtida da reação de PCR em tempo real de DNA das adulterações intencionais de azeite de oliva extra-virgem com óleo de soja, com os pares de primers Olea93 e Lec77, utilizando-se como padrão interno DNA de azeitona e de soja, respectivamente.

V. CONCLUSÃO

Para as análises conduzidas por cromatografia gasosa, os picos presentes em alguns dos cromatogramas foram de baixa intensidade e, muitas vezes, eluíram próximo ao solvente. A troca do cromatógrafo GC-14B pelo GC-2010 foi positiva pois, passou-se a utilizar o injetor do tipo PTV e, com isso, a frente do solvente que antes era grande, diminuiu.

Após o teste de três diferentes métodos de extração de DNA, obteve-se um quarto método híbrido, resultado da junção de algumas etapas do que foi proposto por Giménez, M. J. *et al.*, 2010 com as etapas finais do protocolo do kit comercial DNeasy mini Plant (Qiagen). Como foi mostrado nos géis de agarose, apenas a amostra de azeite de oliva extra-virgem amplificou com PCR-RAPD quando o DNA foi extraído pelos métodos DNeasy *mericon* Food kit (Qiagen), DNA Extractor kit (Eurofins) e CTAB-hexano-clorofórmio (Giménez, M. J., *et al.* 2010), enquanto que a amostra de óleo de soja não amplificou. O óleo de soja é uma matriz que sofre um maior processamento, como o cozimento, a extração e o processo de refino, durante a sua fabricação (Mandarino & Roessing, 2001), já o azeite de oliva extra-virgem é obtido através de prensagem mecânica das azeitonas (www.oliva.org.br). Dessa forma, devido ao processo de extração e amplificação de DNA de óleo de soja se torna muito mais difícil, pois a molécula de DNA está presente nessa matriz em baixíssimas concentrações além de se apresentar muito degradada.

O método proposto nesse trabalho, CTAB-hexano-clorofórmio seguido das etapas de purificação do kit DNeasy Plant (Giménez, M. J., *et al.* 2010 e DNeasy Plant - Qiagen), obteve sucesso tanto na extração de DNA de azeite de oliva extra-virgem quanto na de óleo de soja, o que pode ser comprovado pelo gel de agarose (gel 2 da figura 5), além de também poder ser aplicado em matrizes íntegras ou *in natura*, como a soja e a azeitona.

As reações de PCR em tempo real, utilizando oligonucleotídeos iniciadores selecionados para a detecção de genes específicos de azeitona e soja, mostraram resultados satisfatórios com eficiência de 0,83 e 0,79, respectivamente. Enquanto que os LODs e LOQs foram 5,1 e 10,2 µg/mL para a azeitona e 0,18 e 0,36 µg/mL para a soja, respectivamente.

Em relação às duas metodologias utilizadas neste trabalho para a detecção de óleo de soja em azeite de oliva extra-virgem, algumas ideias são propostas para trabalhos futuros:

- Extratos mais concentrados de DNA e de fitoesteróis precisam ser obtidos: na extração de DNA deveria ser incluída uma etapa final de concentração DNA isolado, como a concentração a vácuo, enquanto que no caso dos fitoesteróis, poderia-se talvez partir de uma massa maior de amostra (1 g, por exemplo) e utilizar um volume intermediário de solvente na etapa final após a reação de silição (100 µL de isopropanol)
- Para a reação de PCR em tempo real, seria necessário o desenho de novos pares de oligonucleotídeos iniciadores já que o par utilizado não amplificou com o DNA extraído a partir de azeite de oliva extra-virgem. O interessante seria a obtenção de um par de *primer* que gerasse um produto de PCR menor que 93 pares de base.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrimonti, C., Vietina, M., Pafundo, S., & Marmiroli, N. (2011). The use of food genomics to ensure the traceability of olive oil. *Trends in Food Science & Technology*, 22(5), 237–244. doi:10.1016/j.tifs.2011.02.002
2. Arlorio, M., & Coisson, J. (2010). Olive oil adulterated with hazelnut oils: simulation to identify possible risks to allergic consumers. *Food Additives and Retrieved* from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030903225799>
3. Barros, N., Oliveira, E., & Marin, V. (2008). em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos; Applicability of the real-time polymerase chain. *Rev. nutr*, 21(1), 85–92. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=480148&indexSearch=ID>
4. Breu, F., Guggenbichler, S., & Wollmann, J. (2008). No Title. *Vasa*, 14(7), 549–550. Retrieved from <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
5. Costa, J., Mafra, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2012). Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. *Trends in Food Science & Technology*, 26(1), 43–55. doi:10.1016/j.tifs.2012.01.009
6. Giegerich, R., Meyer, F., & Schleiermacher, C. (1996). GeneFisher--software support for the detection of postulated genes. *Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 4, 68–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8877506>
7. Giménez, M., Pistón, F., Martín, A., & Atienza, S. (2010). Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. *Food chemistry*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609006414>
8. He, J., Xu, W., Shang, Y., Zhu, P., Mei, X., Tian, W., & Huang, K. (2013). Development and optimization of an efficient method to detect the

- authenticity of edible oils. *Food Control*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512003805>
9. International Union of Pure and Applied Chemistry (2002). Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report).
 10. Itoh, T., Tamura, T., & Matsumoto, T. (1973). Sterol composition of 19 vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 50(4), 122–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4707293>
 11. Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A. H. (2011). Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, 98(2), 137–44. doi:10.1016/j.ygeno.2011.04.009
 12. Lampi, A., Juntunen, L., Toivo, J., & Piironen, V. (2002). Determination of thermo-oxidation products of plant sterols. *Journal of Chromatography B*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023202000946>
 13. Mandarino, J., & Roessing, A. (2001). Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos. *Embrapa Soja. Documentos*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2012/BR/BR2012104000040.xml;BR20011462866>
 14. Menendez, J. (2008). Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *International ...*, 433–439. doi:10.3892/ijmm
 15. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012). Instrução Normativa nº1
 16. Ribeiro, F. de L., & Ferreira, M. (2008). Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim. Nova*. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n1/a29v31n1.pdf>
 17. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. e Crouch, S. R. Fundamentos de Química Analítica. 8ª edição – São Paulo: Cengage Learning, 2010.
 18. T.A. Brown. Gene Cloning e DNA Analysis: an introduction. 6ª edição – Manchester: Willey-Blackwell, 2011.

19. Visioli, F., & Galli, C. (2000). Olive oil: more than just oleic acid. *The American journal of clinical nutrition*, 72(3), 853. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966910>
20. Woolfe, M., & Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *TRENDS in Biotechnology*, 22(5), 222–6. doi:10.1016/j.tibtech.2004.03.010
21. Wu, Y., Chen, Y., Ge, Y., Wang, J., Xu, B., Huang, W., & Yuan, F. (2008). Detection of olive oil using the Evagreen real-time PCR method. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1117–1124. doi:10.1007/s00217-008-0827-9

ANEXO A

Extração através do kit DNeasy *mericon* Food (Qiagen) (Standard Protocol)

1. Pipetar 6 alíquotas de 200 μ L de amostra (homogeneizada) em tubo de 2 mL; adicionar 1 mL do Tampão de Lise e 2,5 μ L de solução de Proteinase K. Agitar vigorosamente;
2. Incubar por 30 minutos/60 °C em banho-maria, agitando em vortex a cada 10 minutos. Resfriar os tubos em banho de gelo após a incubação para favorecer a precipitação de inibidores;
3. Centrifugar por 5 minutos a 2500 x g;
4. Pipetar 500 μ L de clorofórmio para tubo de 2 mL;
5. Pipetar o volume máximo possível de sobrenadante resultante da etapa 3 de cada um dos 6 tubos (cuidadosamente para que o precipitado de inibidores não se misture ao restante da solução), combinando todas as alíquotas de sobrenadante em um mesmo tubo e homogeneizar pipetando;
6. Transferir 700 μ L desse *pool* de sobrenadante para o tubo contendo clorofórmio;
7. Agitar vigorosamente os tubos por 15 segundos e centrifugar por 15 minutos a 14000 x g;
Obs: caso o sobrenadante não fique “limpo”, centrifugar novamente por mais 5 minutos.
8. Pipetar 350 μ L do tampão PB em um tubo de 2 mL, adicionar 350 μ L da fase aquosa superior resultante do item 7 e homogeneizar em vortex;
9. Pipetar a solução do item anterior na coluna QIAquick spin e centrifugar por 1 minuto a 17900 x g e descartar a solução do tubo de coleta (reutilizar o tubo de coleta);

10. Adicionar 500 μ L do tampão AW2 na coluna QIAquick, centrifugar por 1 minuto a 17900 x g e descartar a solução do tubo de coleta (trocar o tubo de coleta por um novo). Centrifugar novamente por 1 minuto a 17900 x g para secar a membrana;

11. Transferir a coluna QIAquick para um tubo de 2 mL ou de 1,5 mL e pipetar 150 μ L do tampão EB diretamente na membrana da coluna QIAquick. Incubar por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a 17900 x g para eluir o DNA.

ANEXOB

Extração através do kit DNA Extractor (Eurofins)

1. Pipetar 500 μ L de óleo em 4 tubos de 2 mL e adicionar 10 mL do tampão de lise e 10 μ L de proteinase K;
2. Incubar por 2 horas/60 °C em banho-maria, agitando os tubos em vortex a cada 15 minutos;
3. Centrifugar por 10 minutos/14500 rpm e transferir 800 μ L do sobrenadante para outro tubo de 2 mL;
4. Adicionar 600 μ L de clorofórmio e misturar em vortex;
5. Centrifugar por 15 minutos/14500 rpm;
6. Transferir o sobrenadante dos quatro tubos para um único tubo de 2 mL e adicionar 2 μ L da solução de glicogênio;
7. Adicionar 480 μ L de isopropanol 80%, misturar em vortex vigorosamente e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente para precipitar o DNA;
8. Centrifugar por 15 minutos/14500 rpm para precipitar o DNA e descartar o sobrenadante;
9. Adicionar 500 μ L de etanol 75% ao *pellet* de DNA e agitar os tubos em vortex;
10. Centrifugar por 5 minutos/14500 rpm e descartar o sobrenadante;
11. Centrifugar novamente por 1 minuto/14500 rpm, remover cuidadosamente o sobrenadante utilizando uma micropipeta e descartá-lo;
12. Secar o pellet de DNA na grade do fluxo laminar e solubilizá-lo em 50 μ L de TE 0,2X.

ANEXO C

Extração através do método CTAB-hexano-clorofórmio (Giménez, M. J., et al 2010)

1. Pipetar 500 μ L de óleo em 8 tubos de 2 mL. Adicionar 250 μ L de tampão de lise CTAB (2% CTAB, NaCl 1,4 M, DTT 50 μ M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0), 250 μ L de hexano e agitar em vortex;
2. Incubar por 30 minutos/60 °C em banho-maria, agitando os tubos em vortex a cada 10 minutos;
3. Adicionar 500 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) gelado e centrifugar por 30 minutos/14000 rpm/4 °C;
4. Transferir 1 mL da fase superior para outro tubo e adicionar 1 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v);
5. Centrifugar por 30 minutos/14000 rpm/4 °C e transferir a fase aquosa para outro tubo (tubo novo) anotando o volume;
6. Adicionar 10-20 μ g/mL de acrilamida linear e 1 volume de fase aquosa (anotado na etapa anterior) de isopropanol gelado;
7. Homogeneizar por inversão e incubar a -20 °C overnight;
8. Centrifugar por 30 minutos/14000 rpm/4 °C e descartar o sobrenadante.
9. Lavar o pellet com 500 μ L de etanol/água 70% (v/v);
10. Centrifugar por 30 minutos/14000 rpm/4 °C e descartar o sobrenadante;
11. Centrifugar por 10 segundos/14500 rpm e retirar cuidadosamente com a pipeta o sobrenadante;
12. Secar o *pellet* de DNA na grade do fluxo laminar, ressuspender em 12,5 μ L de TE 0,1X e, em seguida, juntar todas as alíquotas de DNA em um único tubo.

ANEXO D

Extração através do método CTAB-hexano-clorofórmio + DNeasy Plant mini kit (Giménez, M. J., et al 2010 + DNeasy Plant - Qiagen)

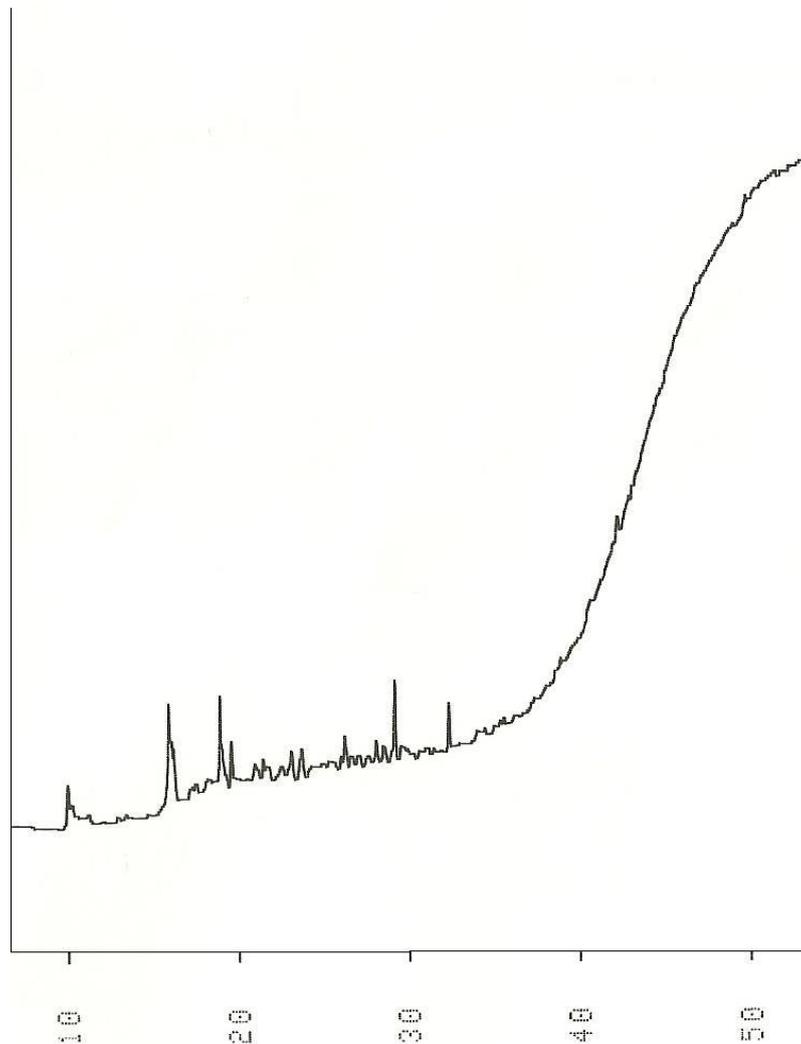
1. Pipetar 500 µL de óleo em 8 tubos de 2 mL. Adicionar 250 µL de tampão de lise CTAB (2% CTAB, NaCl 1,4 M, DTT 50 µM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0), 250 µL de hexano e agitar em vortex;
2. Incubar por 30 minutos/60 °C em banho-maria, agitando os tubos em vortex a cada 10 minutos;
3. Adicionar 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) gelado e centrifugar por 30 minutos/14000 rpm/4 °C;
4. Transferir 1 mL da fase superior para outro tubo e adicionar 1 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v);
5. Centrifugar por 30 minutos/14000 rpm/4 °C e transferir a fase aquosa de cada um dos 8 tubos para um único tubo (tubo novo) anotando o volume de cada uma;
6. Dividir o volume total em dois tubos (tubos novos) e adicionar a cada uma deles 1,5 volumes de solução AW1 e homogeneizar pipetando;
7. Aplicar 650 µL dessa mistura na coluna, centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm e descartar o filtrado. Repetir esse procedimento até que toda a mistura tenha sido aplicada na coluna;
8. Adicionar 500 µL de AW2 na coluna, centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm e descartar o filtrado;
9. Adicionar 500 µL de AW2 na coluna novamente, centrifugar por 2 minutos a 13500 rpm e descartar o filtrado;
10. Transferir a coluna para um tubo de 2 mL (novo) e aplicar 25 µL de AE (previamente aquecido a 65 °C) na coluna, incubar por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a 14500 rpm para eluir o DNA. Repetir essa etapa mais uma vez.

ANEXO E

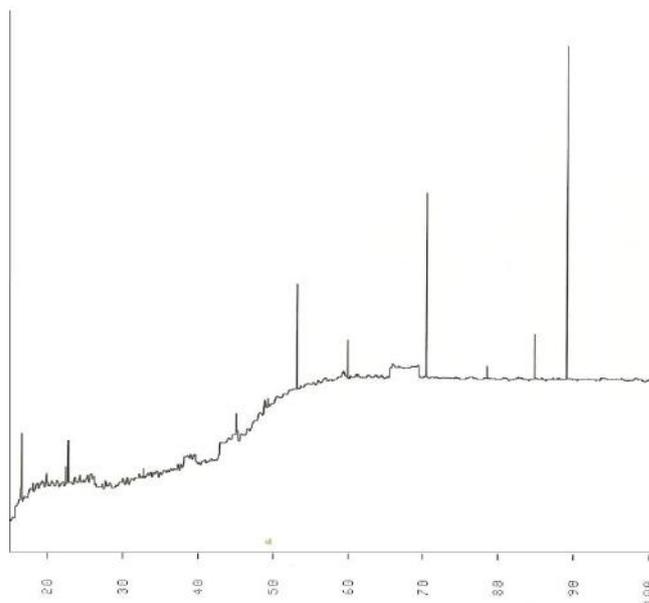
Preparo de gel de agarose 2,0% (p/v)

1. Pesar 6,0 g de agarose, transferir para erlenmeyer de 500 mL e adicionar 300 mL de tampão TBE 1X (0,1 mM Tris-acetato; pH 8,4; 0,09 mM ácido bórico e 0,001 mM EDTA);
2. Aquecer em microondas até a completa solubilização da agarose;
3. Deixar a solução resfriar (até aproximadamente 60 °C), adicionar 15 µL de solução de brometo de etídio 10 µg/mL e verter a solução no suporte do gel da cuba de eletroforese;
4. Após a completa polimerização do gel o suporte pode ser colocado na cuba de eletroforese, onde deve conter tampão TBE 1X em quantidade suficiente para cobrir totalmente o gel;
5. Em seguida as amostras podem ser aplicadas nos poços.

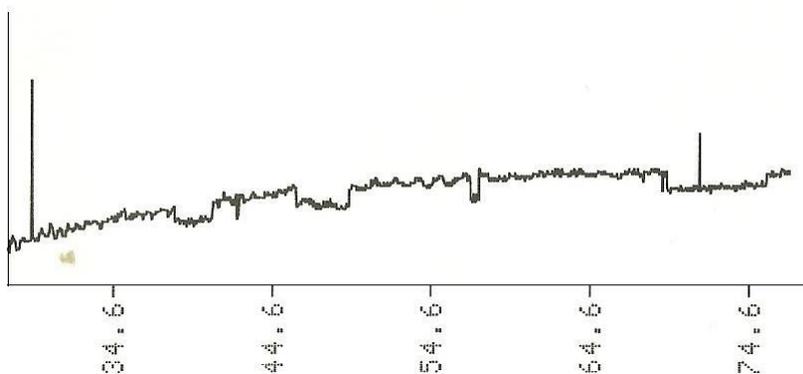
ANEXO F

Cromatogramas:

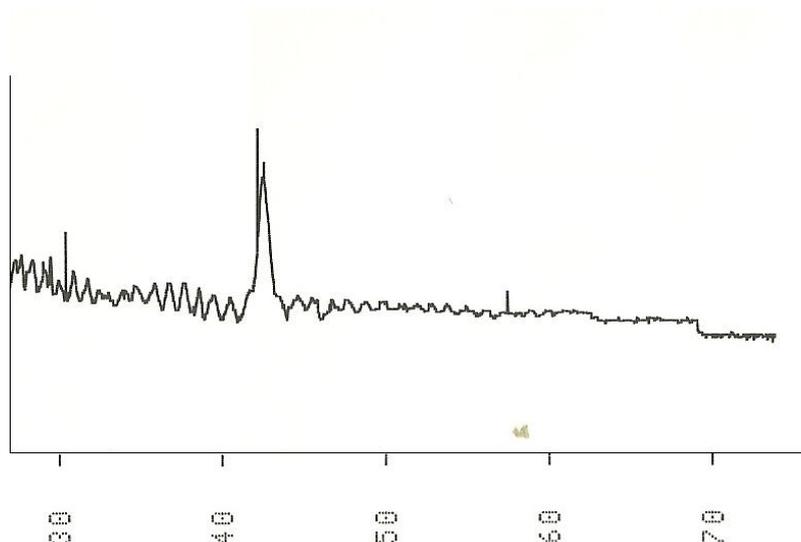
1. Cromatograma parcial referente a fração de fitoesteróis não oxidados da amostra de óleo de soja. Condições de análise: vazão de hélio na saída do divisor = 60 mL/min, período de *splitless* = 2 minutos e gradiente de temperatura da coluna = 40 °C (2') + 10 °C/min até 200 °C + 3 °C/min até 275 °C (40'); eixo horizontal - tempo em minutos, eixo vertical abundância. Derivatização 1.



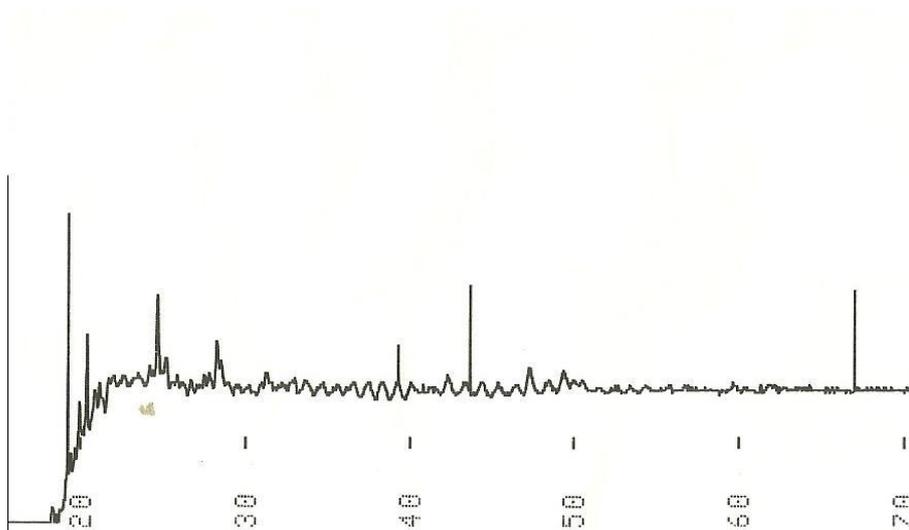
2. Cromatograma parcial referente a fração de fitoesteróis oxidados da amostra de óleo de soja. Condições de análise: vazão de hélio na saída do divisor = 40 mL/min, período de *splitless* = 3 minutos e gradiente de temperatura da coluna = 40 °C (2') + 10 °C/min até 200 °C + 2 °C/min até 260 °C (40'); eixo horizontal - tempo em minutos, eixo vertical abundância. Derivatização 1.



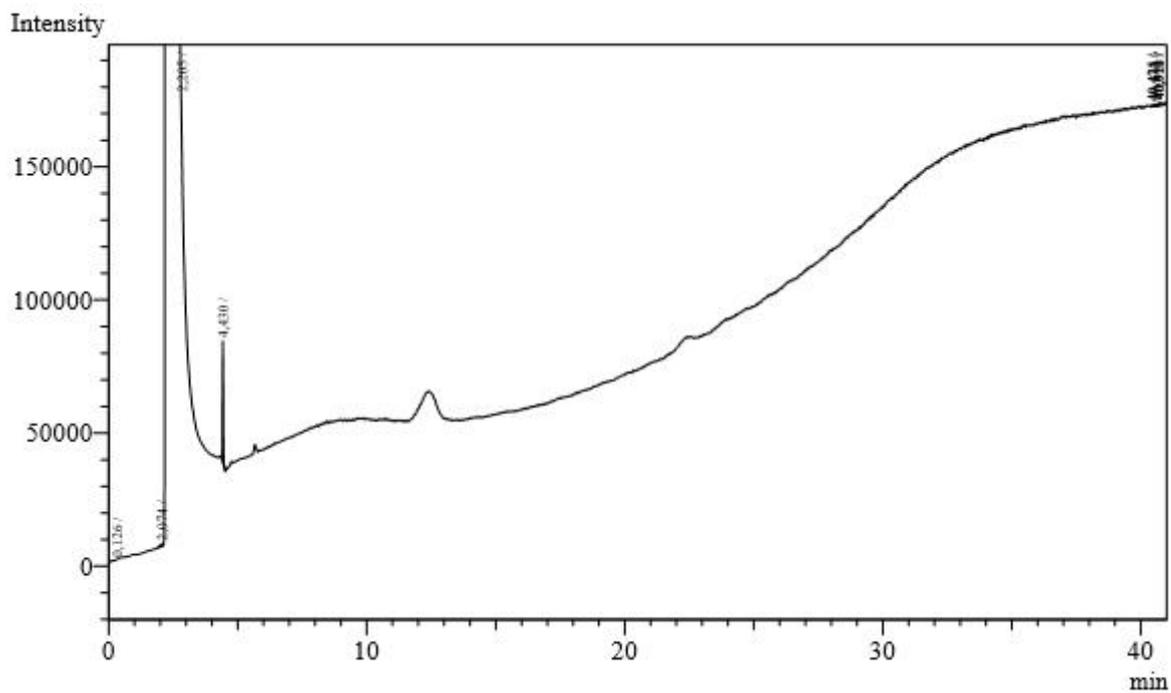
3. Cromatograma parcial referente a fração de fitoesteróis não oxidados da amostra de óleo de soja. Condições de análise: vazão de hélio na saída do divisor = 40 mL/min, período de *splitless* = 3 minutos e gradiente de temperatura da coluna = 40 °C (3') + 30 °C/min até 250 °C + 3 °C/min até 275 °C (45'); eixo horizontal - tempo em minutos, eixo vertical abundância. Derivatização 1.



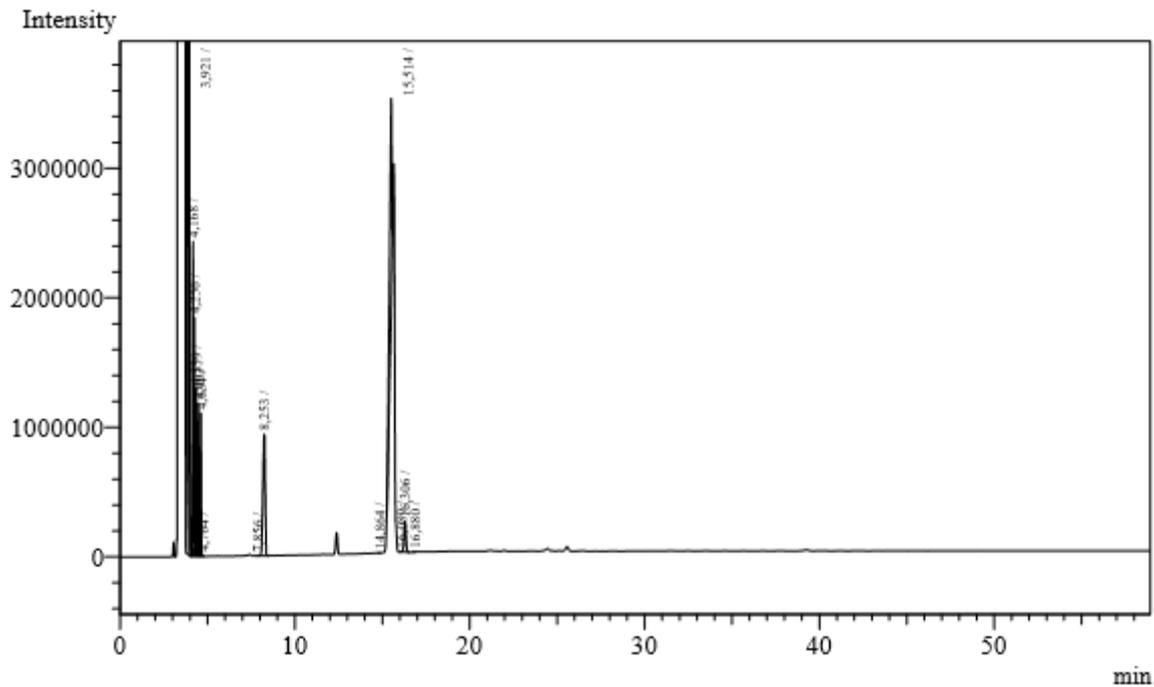
4. Cromatograma parcial referente a fração de fitoesteróis não oxidados da amostra de óleo de soja. Condições de análise: vazão de hélio na saída do divisor = 40 mL/min, período de *splitless* = 3 minutos e gradiente de temperatura da coluna = 40 °C (3') + 30 °C/min até 250 °C + 3 °C/min até 275 °C (60') /min; eixo horizontal - tempo em minutos, eixo vertical abundância. Derivatização 1.



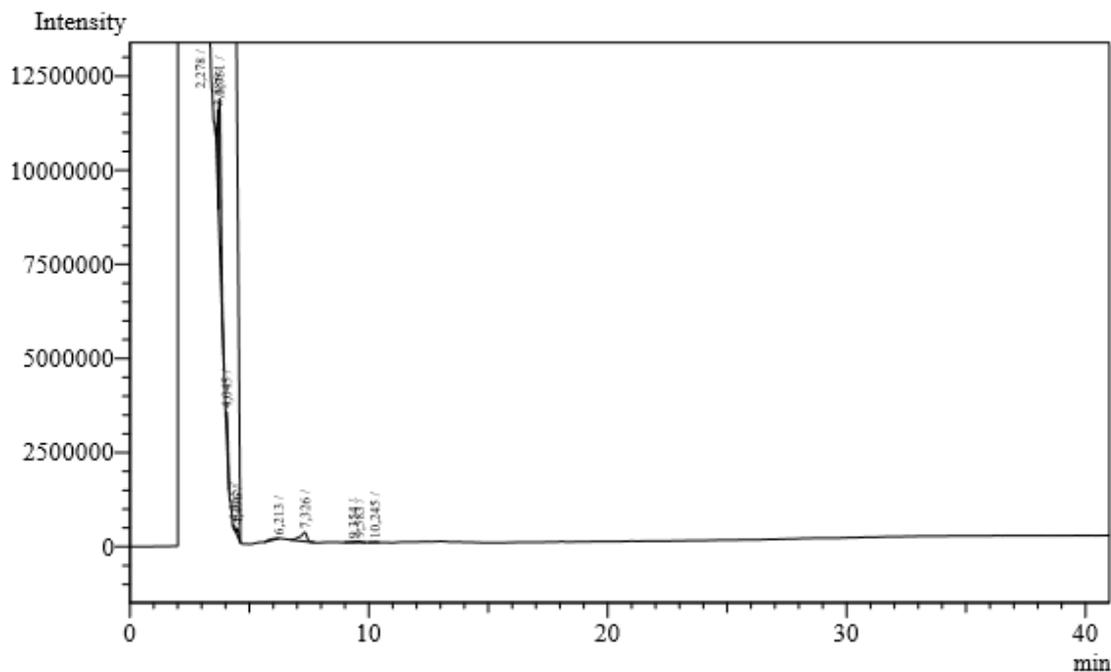
5. Cromatograma parcial referente a fração de fitoesteróis oxidados da amostra de óleo de soja. Condições de análise: vazão de hélio na saída do divisor = 40 mL/min, período de *splitless* = 3 minutos e gradiente de temperatura da coluna = 40 °C (3') + 30 °C/min até 250 °C + 3 °C/min até 275 °C (60') /min; eixo horizontal - tempo em minutos, eixo vertical abundância. Derivatização 1.



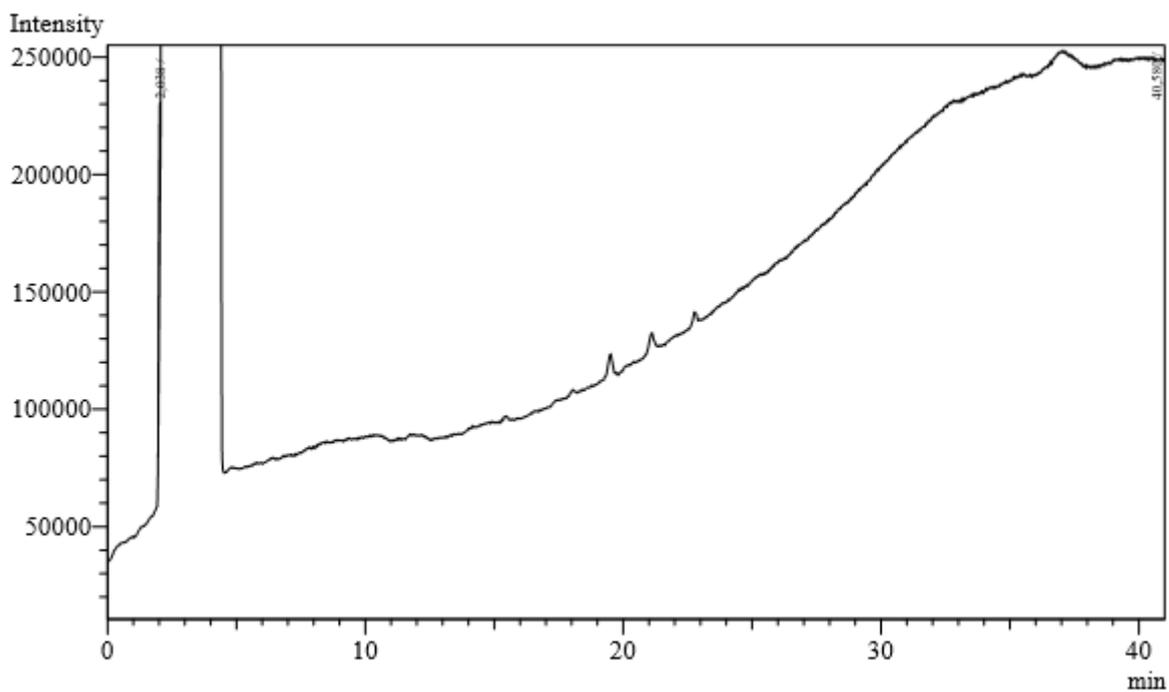
6. Cromatograma referente ao padrão de β -sitosterol. Condições de análise: injeção PTV/splitless 300 °C, período de *splitless* = 2 minutos e gradiente de temperatura da coluna = 260 °C (1') + 1 °C/min até 290 °C (41'). Derivatização 2.



7. Cromatograma referente ao branco. Condições de análise: injeção PTV/splitless 40 - 300 °C, período de *splitless* = 2 minutos e gradiente de temperatura da coluna = 260 °C (1') + 1 °C/min até 290 °C (41'). Derivatização 2.



8. Cromatograma referente a amostra de azeite de oliva extra-virgem. Condições de análise: injeção PTV/splitless 70 – 300 °C, período de *splitless* = 2 minutos e gradiente de temperatura da coluna = 260 °C (1') + 1 °C/min até 290 °C (41'). Derivatização 2.



9. Cromatograma referente a amostra de óleo de soja. Condições de análise: injeção PTV/splitless 70 – 280 °C, período de *splitless* = 2 minutos e gradiente de temperatura da coluna = 260 °C (1') + 1 °C/min até 290 °C (41'). Derivatização 2.