



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza  
Instituto de Química  
**Projeto Final de Curso**  
**IQWX01**

**Aplicação de método baseado em PCR em tempo real para  
detecção de glúten em alimentos destinados a portadores  
de doença celíaca**

Jéssica Pereira Machado

Rio de Janeiro

Março/2012

Aplicação de método baseado em PCR em tempo real para detecção de glúten em alimentos destinados a portadores de doença celíaca

**Autora:**

**Jéssica Pereira Machado**

**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:**

**Prof. Dr. Alexandre Guedes Torres (IQ/DBQ/UFRJ)**

**Co-orientadora:**

**Dr<sup>a</sup> Edna Maria Morais Oliveira (Embrapa)**

Rio de Janeiro

Março/2012

Machado, Jéssica Pereira.

Aplicação de método baseado em PCR em tempo real para detecção de glúten em alimentos destinados a portadores de doença celíaca / Jéssica Pereira Machado – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2012.65 f.

Dissertação (Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Matemática e da Natureza, Instituto de Química / DBQ, 2012.

Orientadores: Alexandre Guedes Torres e Edna Maria Morais Oliveira

1. Doença Celíaca. 2. Glúten. 3. Fontes de Glúten. 4. Métodos de detecção. I. Torres, Alexandre Guedes (Orient.) II. Oliveira, Edna Maria Morais (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

## **Agradecimentos**

*Primeiramente agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida, pela saúde e sabedoria para desenvolver este trabalho e por ter cruzado o caminho de pessoas tão queridas que tornaram meu trabalho muito mais prazeroso.*

*Em especial aos meus pais, Angela Maria Pereira e João Batista Machado, e a todos familiares, por toda educação, amor e carinho, que me foram dados, pelo apoio psicológico e financeiro que sempre me deram, desde o início da vida, por acreditarem em mim e nos meus sonhos, por confiarem nas minhas escolhas e por me incentivarem a seguir o caminho que escolhi.*

*Aos orientadores Prof Dr. Alexandre Guedes Torres e Dr<sup>a</sup> Edna Maria Morais Oliveira, pela amizade e dedicação, me auxiliando no desenvolvimento do projeto, sanando minhas dúvidas e contribuindo com a evolução deste trabalho e com meu crescimento profissional.*

*Ao Prof Dr. Anderson de Sá Pinheiro, por todo estímulo, conselho e por acreditar na minha capacidade de concluir o que foi proposto.*

*Aos amigos de graduação, Rodolfo Barboza, Sanair Massafra, Thaís Alves, Michelle Chagas, Érica Azevedo, Alline Viana, Carlos Eduardo e Felipe Fantuzzi com quem pude dividir minhas alegrias e compartilhar bons momentos. Agradeço pela amizade e por sempre me darem forças para seguir em frente.*

*A todos os funcionários e colegas da Embrapa Agroindústria de Alimentos, em especial a Tatiane, Ivanilda, Felipe e Tiago, por me acolherem com carinho e por todo apoio e paciência que tiveram para me ajudar e por alegrarem meu dia.*

*Ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, agradeço pelo incentivo e por todas as oportunidades.*

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES: FIGURAS E TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xii
I – INTRODUÇÃO.....	1
II – OBJETIVO.....	3
III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1 – Doença Celíaca.....	4
2 – Glúten.....	6
2.1 – Importância tecnológica do glúten na formação da massa.....	6
2.2 – O glúten na indústria.....	7
3 – Técnicas convencionais para detecção de glúten em alimentos.....	8
3.1 – Técnicas moleculares para detecção de glúten em alimentos.....	9
3.1.1 – PCR qualitativa.....	9
3.1.2 – PCR em tempo real.....	10
IV – MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
1 – Utilização de ferramentas de bioinformática na construção de <i>primers</i> para detecção de sequências específicas de DNA.....	14
2 – Alimentos analisados.....	14
3 – Extração do DNA genômico.....	15
4 – PCR qualitativa para avaliação dos iniciadores referentes a este trabalho.....	15

5 – Detecção dos produtos da amplificação.....	16
6 – Seleção dos iniciadores: Condições para PCR em tempo real por SYBR Green.....	16
7 – Condições para PCR em tempo real usando o sistema TaqMan.....	17
V – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
1 – Extração e purificação do DNA genômico – método híbrido CTAB/DNeasy.....	19
1.1 – Extração e Quantificação do DNA genômico – amostras fontes de glúten.....	19
1.2 – Extração e Quantificação do DNA genômico – amostras comerciais.....	20
2 – PCR qualitativa.....	22
3 – PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green.....	25
4 – PCR em tempo real usando o sistema TaqMan.....	27
4.1 – Teste de especificidade dos primers.....	28
4.2 – Curva Padrão, Limite de Detecção e Eficiência da Reação.....	30
4.3 – Análise de alimentos processados quanto à presença de glúten.....	33
4.4 – Avaliação do efeito de matriz em alimentos processados “livres de glúten” para a presença de DNA de glúten.....	38
VI – CONCLUSÕES.....	41
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
APÊNDICE A.....	47
APÊNDICE B.....	49

APÊNDICE C.....50

APÊNDICE D.....51

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES: FIGURAS E TABELAS

### FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mucosa do intestino delgado com vilosidade normal (a) e com vilosidade atrofiada (b).....	5
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do princípio da técnica de PCR.....	10
<b>Figura 3:</b> Representação da ação da TaqDNA polimerase na sonda TaqMan durante a fase de extensão da q-PCR.....	11
<b>Figura 4:</b> Representação da ação do corante SYBR Green na dupla fita de DNA formada após q-PCR.....	12
<b>Figura 5:</b> Amplificação em PCR quantitativo em tempo real.....	12
<b>Figura 6:</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% para análise do rendimento da extração do DNA de amostras fontes de glúten.....	19
<b>Figura 7:</b> Eletroforese em gel de agarose 2% para análise do rendimento da extração do DNA de amostras comerciais.....	21
<b>Figura 8:</b> Eletroforese em gel de agarose 2% para validação dos oligonucleotídeos iniciadores referentes ao alvo Avenina.....	22
<b>Figura 9:</b> Eletroforese em gel de agarose 2% para validação dos oligonucleotídeos iniciadores referentes ao alvo Gliadina.....	23
<b>Figura 10:</b> Eletroforese em gel de agarose 2% para validação dos oligonucleotídeos iniciadores referentes ao alvo Hordeína.....	24
<b>Figura 11:</b> Eletroforese em gel de agarose 2% para validação dos oligonucleotídeos iniciadores referentes ao alvo Secalina.....	25
<b>Figura 12:</b> Curva de Dissociação das amostras fontes de glúten após PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green com o iniciador do alvo Secalina.....	26



<b>Figura 13:</b> Curva de Dissociação das amostras fontes de glúten após PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green com o iniciador do alvo Hordeina .....	27
<b>Figura 14:</b> Curva de Amplificação após q-PCR com os primers e sondas para as amostras fontes de glúten (aveia, centeio, cevada e trigo) em duplicata.....	28
<b>Figura 15:</b> Curva de Amplificação após q-PCR com os primers e sondas para as amostras fontes de glúten (aveia, centeio, cevada e trigo) – Teste de especificidade.....	29
<b>Figura 16:</b> Curva Analítica obtida com o log das concentrações da amostra de aveia e o Ct médio em cada concentração, utilizando os iniciadores A1F, A1R e sonda A1P.....	30
<b>Figura 17:</b> Curva Analítica obtida com o log das concentrações da amostra de centeio e o Ct médio em cada concentração, utilizando os iniciadores S1F, S1R e sonda S1P.....	31
<b>Figura 18:</b> Curva Analítica obtida com o log das concentrações da amostra de cevada e o Ct médio em cada concentração, utilizando os iniciadores H1F, H1R e sonda H1P.....	31
<b>Figura 19:</b> Curva Analítica obtida com o log das concentrações da amostra de trigo e o Ct médio em cada concentração, utilizando os iniciadores G1F, G1R e sonda G1P.....	32
<b>Figura 20:</b> Curva de Amplificação após q-PCR para as amostras designadas “livre de glúten” utilizando os iniciadores e sondas validados por CAO; XU; ZHENG (2010).....	34
<b>Figura 21:</b> Curva de Amplificação após q-PCR para as amostras designadas “contém glúten” utilizando os iniciadores e sondas validados por CAO; XU; ZHENG (2010).....	35
<b>Figura 22:</b> Curva de Amplificação após q-PCR para as amostras designadas naturalmente livre de glúten utilizando os iniciadores e sondas validados por CAO; XU; ZHENG (2010).....	37

**Figura 23:** Curva de Amplificação modelo após q-PCR para amostra de creme de arroz sem fortificação e com fortificação (centeio), utilizando os iniciadores S1F, S1P e sonda S1P.....39

## TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Quantificação após extração de DNA das amostras de aveia, centeio, cevada, farinha de trigo comercial e trigo.....	20
<b>Tabela 2:</b> Quantificação após extração de DNA da amostra de farinha de trigo.....	22
<b>Tabela 3:</b> Limite de Detecção e Eficiência da Reação, calculados a partir dos resultados obtidos na Curva Padrão da q-PCR.....	33
<b>Tabela 4:</b> Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação após q-PCR para amostras “livres de glúten” .....	35
<b>Tabela 5:</b> Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação após q-PCR para amostras “contém glúten” .....	36
<b>Tabela 6:</b> Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação após q-PCR para amostras naturalmente livres de glúten.....	38
<b>Tabela 7:</b> Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação após q-PCR para amostras fortificadas.....	40

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

<b>ACELBRA</b>	Associação de Celíacos do Brasil
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Ct</b>	Ciclo <i>treshold</i>
<b>DC</b>	Doença Celíaca
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>E</b>	Eficiência da reação
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>Embrapa</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>F</b>	Fator de conversão
<b>g</b>	Gramma
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>L</b>	Litro
<b>LOD</b>	Limite de Detecção
<b>Log</b>	Logaritmo
<b>mA</b>	Miliampère
<b>mg</b>	Miligrama

<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>pM</b>	Pico molar
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>q- PCR</b>	PCR em tempo real
<b>s</b>	Segundo
<b>TE</b>	tampão de eluição
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Volt
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>σ</b>	Desvio padrão

## RESUMO

### PROJETO DE CURSO – IQWX01

**TÍTULO:** APLICAÇÃO DE MÉTODO BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE GLÚTEN EM ALIMENTOS DESTINADOS A PORTADORES DE DOENÇA CELÍACA

**ALUNO:** Jéssica Pereira Machado

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Alexandre Guedes Torres, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

**CO-ORIENTADORA:** Dr<sup>a</sup> Edna Maria Morais Oliveira – Embrapa Agroindústria de Alimentos

A doença celíaca é uma intolerância permanente às proteínas contidas no glúten de alguns cereais. É caracterizada por atrofia da mucosa do intestino delgado proximal e consequente má absorção dos nutrientes, em indivíduos geneticamente susceptíveis. Os métodos convencionais para a detecção de glúten são baseados na determinação da presença das proteínas, o que pode resultar em falsos negativos. Em contrapartida, muitos pesquisadores vêm desenvolvendo métodos baseados em PCR para detecção de DNA. O presente trabalho busca aplicar um método baseado em q-PCR para detecção de glúten em alimentos destinados a celíacos. Para isso, metodologias baseadas na detecção de sequências de DNA foram efetuadas para amostras de trigo, cevada, aveia, centeio e produtos “livres de glúten”, “naturalmente livres de glúten” e “contém glúten”. Inicialmente foram construídos *primers* específicos para a detecção das sequências de DNA das proteínas que formam o complexo glúten. Após o isolamento do DNA das amostras supracitadas, estes *primers* foram testados usando PCR qualitativa. Os *primers* selecionados foram então testados em q-PCR com o sistema SYBR Green, para aumento da sensibilidade. Entretanto, os resultados não foram aceitáveis, ficando claro que para uso do Sistema SYBR Green será necessário o desenho de novos *primers*. Em seguida, foram testados *primers* e sondas TaqMan já validados por q-PCR pelo sistema TaqMan. A partir dos resultados foram estabelecidas a eficiência da reação, que variou de 98,44 a 101,65%, e o limite de detecção que variou de 0,59 a 2,08 ng/ $\mu$ L. Após determinar estes parâmetros de validação, foram realizadas análises de q-PCR para as amostras processadas para verificar possíveis efeitos de matriz, o resultados foram aceitáveis. Sendo assim, foi possível detectar glúten por q-PCR o que aumenta a confiabilidade dos resultados a partir da aplicação de um método mais sensível e eficaz.

## I - INTRODUÇÃO

---

As reações adversas a alimentos compreendem uma grande variedade de sintomas clínicos relacionados à ingestão de determinado componente de um alimento. Ainda que manifestações sejam semelhantes, o mecanismo que envolve tais reações é o que define um caso de alergia ou intolerância (COCCO & SOLÉ, 2009). Os cereais trigo, aveia, centeio e cevada podem desencadear doença celíaca (enteropatia glúten-sensível), que é causada por uma resposta imune inadequada as proteínas contidas no glúten de alguns cereais, gliadina (trigo), secalina (centeio) e hordeína (cevada). As manifestações clínicas mais frequentes são: diarreia crônica, vômitos, irritabilidade, anorexia, déficit no crescimento, distensão abdominal, diminuição do tecido celular subcutâneo e atrofia da musculatura glútea (SDEPANIAN *et al.*, 2001).

Muitos produtos, principalmente os de panificação são formulados à base de trigo e outros cereais considerados fontes das proteínas formadoras do glúten. Tais proteínas, por sua vez, são as responsáveis pela habilidade destes cereais na formação da massa viscoelástica que retém o gás produzido durante a fermentação e nos primeiros estágios de cozimento (TEDRUS *et al.*, 2001).

Uma vez que não existe tratamento para esta doença, os pacientes têm que excluir alimentos fonte de glúten de sua dieta. Para estes consumidores, uma categoria especial de produtos alimentícios designados “livre de glúten” é produzida, sendo que esta deve cumprir requerimentos específicos a respeito do conteúdo de glúten. Tais produtos não devem conter prolamina e o nível de glúten não pode exceder  $20\text{mg.kg}^{-1}$  (PIKNOVÁ; BREZNÁ; KUČHTA, 2008). Uma importante informação aos portadores de doença celíaca em relação ao conteúdo de glúten é dada na rotulagem, como indicado na legislação europeia. Porém, os indivíduos celíacos estão suscetíveis à ingestão inadvertida de glúten devido à rotulagem incorreta. Em algumas produtoras de alimentos destinados a celíacos, é comum que se produza também outros gêneros alimentícios que contenham glúten em sua composição, aumentando a possibilidade de contaminação, já que são processados nas mesmas instalações e equipamentos (FELINTO, 2008).

Deste modo, o desenvolvimento de métodos para a certificação de autenticidade e segurança de alimentos torna-se uma necessidade crescente. Muitos resultados podem apresentar “falsos negativos” para a presença de glúten em consequência do nível de processamento dos alimentos, o que compromete a detecção de proteínas devido à sua desnaturação.

O estudo de técnicas moleculares mais sensíveis e mais confiáveis, baseadas em métodos para detecção de sequências de DNA seria o mais adequado, pois seria possível detectar as proteínas de interesse em produtos com alto nível de processamento. Diante do exposto, o desafio neste trabalho é a definição de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e a otimização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR) para o aumento da sensibilidade na detecção do glúten (HONÓRIO, 2004; NOVAIS & ALVES, 2005).



## II – OBJETIVO

---

O presente trabalho tem por finalidade definir e avaliar a seletividade dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a detecção de glúten de diferentes fontes (trigo, aveia, centeio e cevada) utilizando a técnica de q-PCR.

Conduzir PCR para análise de produtos processados das categorias: “livre de glúten”, “contém glúten”, e produtos naturalmente sem glúten (à base de milho, arroz e mandioca). Conduzir PCR em tempo real usando o sistema SYBR Green e o sistema TaqMan, para o aumento da sensibilidade na detecção de glúten.

### III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

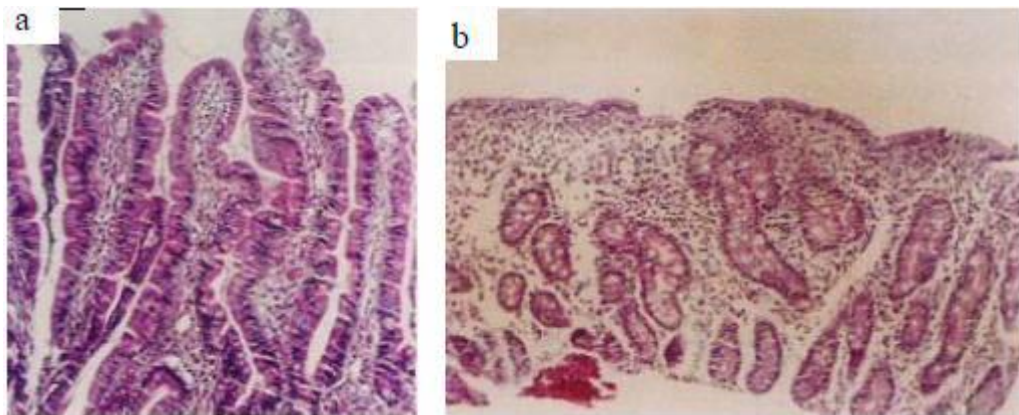
#### 1 – Doença celíaca

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia imunomediada desencadeada em indivíduos geneticamente predispostos, associada à intolerância permanente a ingestão de alimentos que contenham glúten. É caracterizada por danos à superfície da mucosa do intestino, levando a uma incapacidade no aproveitamento de nutrientes, tais como proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e sais minerais necessários para a manutenção da saúde. (CASSOL, 2007; ESCOUTO, 2004). O indivíduo que tem predisposição à enfermidade produz anticorpos ao glúten assim que toma contato com o ingrediente. Os anticorpos agem no intestino delgado, atrofiando-o e o órgão, então, perde a capacidade de absorção de nutrientes (CASTELLÓN, 2001).

A DC pode apresentar-se sobre as seguintes formas: clássica, não clássica e assintomática (SDEPANIAN; MORAIS; NETO, 2001). Samuel Ge, em 1888, descreveu a forma clássica da doença, a qual se inicia nos primeiros anos de vida com diarreia crônica, vômitos, irritabilidade, anorexia, déficit de crescimento, distensão abdominal, diminuição do tecido celular subcutâneo, e atrofia da musculatura glútea. A forma não clássica ou atípica da DC manifesta-se mais tardiamente, com quadro mono ou paucissintomático, no qual as manifestações digestivas estão ausentes, ou quando presentes ocupam um segundo plano. Os pacientes deste grupo podem apresentar manifestações isoladas, como por exemplo baixa estatura, anemia por deficiência de ferro refratária à ferroterapia oral, hipoplasia do esmalte dentário, constipação intestinal, osteoporose, esterilidade, artralgia ou artrite, e epilepsia associada a calcificação intracraniana. O reconhecimento da forma assintomática da doença, especialmente entre familiares de primeiro grau de pacientes celíacos, tornou-se mais fácil a partir do desenvolvimento de marcadores sorológicos específicos para a DC.

De acordo com Marques (2002), a Associação de Celíacos do Brasil (ACELBRA) ainda não tem dados oficiais sobre o número de indivíduos que sofrem a doença no país. Segundo Castellón (2001), um estudo da Universidade de Brasília calcula que existam cerca de 300 mil brasileiros portadores da doença. O diagnóstico da DC

deve ser baseado em três pilares: o exame clínico, por meio de exame físico, e anamnese detalhada além da análise histopatológica do intestino delgado e dos marcadores séricos. O diagnóstico final deve sempre basear-se na biópsia a qual revela a mucosa anormal do intestino delgado proximal, com as vilosidades atrofiadas ou ausentes, aumento no comprimento das criptas e no número de linfócitos intra-epiteliais (RAUEN; BACK; MOREIRA, 2005). A Figura 1 mostra a mucosa do intestino delgado com vilosidades normais (a) e atrofiadas (b). (ACELBRA-RS).



**Figura 1: Mucosa do intestino delgado com vilosidade normal (a) e com vilosida atrofiada (b). (ACELBRA-RS).**

O único tratamento possível e eficaz para DC, em todas as formas clínicas, é o dietético, devendo-se excluir o glúten da alimentação durante toda a vida, o que leva a remissão dos sintomas e restauração da morfologia normal da mucosa intestinal (RAUEN; BACK; MOREIRA, 2005). Por ser uma enfermidade que pode provocar graves alterações gastrointestinais, dentre outras, é importante o conhecimento a cerca dos alimentos que contém ou não contém glúten em sua formulação, trazendo assim, menores intercorrências negativas aos portadores da DC (SDEPANIAN; DE MORAIS; FAGUNDES-NETO, 2001). As frações prolamínicas do glúten encontradas em diferentes cereais, gliadina no trigo, hordeína na cevada, secalina no centeio, e avenina na aveia devem, portanto, ser evitadas.

Afim de que os portadores da DC pudessem identificar os alimentos que não devem consumir, foi promulgada em 1992, a Lei Federal número 8.543, que determinou a impressão da advertência *contém glúten* nos rótulos e embalagens de

alimentos industrializados que apresentam em sua composição derivados do trigo, centeio, cevada e aveia (BRASIL, 1992).

## **2 – Glúten**

O glúten é um complexo proteína-lipídio-carboidrato com a seguinte composição: proteína (75%); carboidratos (15%); lipídios (6%) e minerais (8%). Suas proteínas estão presentes em diversos cereais como trigo, cevada, aveia e centeio. As proteínas dos cereais podem ser classificadas, de acordo com a solubilidade em: albuminas, solúveis em água deionizada; globulinas, solúveis em soluções salinas diluídas; prolaminas, solúveis em soluções alcoólicas a 70-80%; glutelinas solúveis em soluções ácidas ou alcalinas diluídas (SGARBIERI, 1996).

As duas frações protéicas que compõe o glúten são as prolaminas e as glutelinas. As prolaminas são tóxicas ao celíaco e encontram-se no trigo (gliadina), cevada (hordeína), aveia (avenina) e centeio (secalina) (NOBRE; SILVA; CABRAL, 2007). Da grande variedade de aminoácidos que compõe as proteínas do glúten, o ácido glutâmico representa mais de quarenta por cento do total de aminoácidos. O segundo maior em proporção é a prolina, que compõe cerca de quatorze por cento do total de aminoácidos presentes. A presença de prolina impõe restrições sobre a forma que um polipeptídeo pode assumir. Outros aminoácidos que podem afetar a forma da massa, obtida com a manipulação dos cereais, são a glicina, que contribui para flexibilidade, e a leucina, que contribui com importantes interações hidrofóbicas (CHARLEY, 1998).

### **2.1– Importância tecnológica do glúten na formação da massa**

A principal porção de proteínas (85-90%), que constitui a parte essencial para a formação da massa, consiste nas proteínas de reserva armazenadas em corpos protéicos no endosperma dos grãos de trigo, por exemplo. Tais proteína de reserva compõe o complexo glúten, o qual pode ser separado em duas frações, gliadina e glutenina. As moléculas da fração de gliadina são solúveis em solução aquosa de etanol sendo, então, classificadas como prolaminas (CHARLEY, 1998).

As proteínas do glúten desempenham um papel fundamental na determinação da qualidade da farinha, conferindo capacidade de absorção de água, coesividade, viscosidade, e elasticidade na massa. Frações de gliadina e gluteninas, do trigo, são importantes contribuintes para as propriedades reológicas da massa, porém suas funções são divergentes (WIESER, 2007).

Gliadinas hidratadas têm pouca elasticidade e são menos coesivas do que as gluteninas; elas contribuem principalmente para a viscosidade e extensibilidade da massa. Em contrapartida, gluteninas hidratadas são coesas e elásticas e são responsáveis pela força da massa e pela elasticidade. Uma mistura adequada de ambas as frações é essencial para transmitir a propriedade viscoelástica da massa e da qualidade do produto resultante (WIESER, 2007).

Dentre as farinhas dos diferentes cereais, apenas a do trigo tem a habilidade de formar uma massa viscoelástica que retém o gás produzido durante a fermentação e nos primeiros estágios de cozimento da massa, dando origem a um produto leve (TEDRUS *et al.*, 2001). A formação da massa viscoelástica se dá quando as partículas de farinha são molhadas e manipuladas, sendo as proteínas formadoras do glúten as principais responsáveis por tal característica no trigo (CHARLEY, 1998).

Evidências têm mostrado que o glúten do trigo é um polímero amorfo em estado vítreo à temperatura ambiente quando o nível de umidade é tão baixo quanto o que prevalece na farinha. A alta quantidade de líquido utilizada no preparo da massa promove a transição do estado vítreo para um estado semelhante ao da borracha à temperatura ambiente. No estado semelhante à borracha, o glúten pode ser manipulado para formar a massa (CHARLEY, 1998).

## **2.2 – O Glúten na Indústria**

Apesar do seu baixo valor nutricional comparado ao das proteínas de origem animal, a vantagem na utilização do glúten consiste nas características físicas e funcionais que possui e no seu baixo custo. Por consequência, as aplicações do glúten na indústria alimentar são cada vez mais diversas devido às características únicas destas proteínas, como a estabilidade ao calor, efeitos de textura (aumento da extensibilidade dos produtos, retenção de água) e sabor. Pode-se encontrar, por

exemplo, glúten em alimentos vegetarianos como substituto protéico da carne; em queijos sintéticos, oferecendo-lhes características texturais e de paladar semelhantes aos queijos naturais (DAY *et al.*, 2006).

A multiplicação do seu uso na indústria alimentar nas mais variadas vertentes levou ao desenvolvimento de novos ingredientes à base de glúten ou dele derivados como glúten de trigo texturizado, isolados de proteína de trigo, gliadina de trigo, glutenina de trigo, proteína de trigo hidrolisada, glutaminas e o glúten desaminado (ESTELLER; PITOMBO; LANNES, 2005) são usados para produtos lácteos, como substitutos das claras de ovo, em massas, biscoitos, bebidas, barras energéticas e em alimentos vegetarianos.

O número de alimentos com glúten em sua composição tende a aumentar o que constitui um risco para os celíacos que precisam ser cada vez mais cautelosos na escolha de seus produtos alimentícios. Assim, quando em dúvida, ou na ausência de informação no rótulo do produto, o portador de DC não deve adquiri-lo.

Em contrapartida, os produtos da categoria “livre de glúten” são também um mercado em expansão (incluindo pães, bolos, bolachas e farinhas sem glúten), o que pode ser a solução para muitos celíacos que vêem as suas opções alimentares reduzidas. No entanto, os celíacos evitam produtos à base de trigo, cevada ou centeio, devido aos vestígios de glúten. A propósito, o conteúdo de muitos produtos “livres de glúten” provenientes destes cereais chegam a apresentar teores de glúten de 7 a 370 ppm, quantidade suficiente para causar reações aos indivíduos portadores de DC (CHARTRAND *et al.*, 1997; VOGELSANG; GRANDITSCH; DEUTSCH, 1998; CICLITIRA; ELLIS; FAGG, 1988).

### **3 – Técnicas convencionais para detecção de glúten em alimentos**

A detecção das proteínas do glúten em alimentos foi inicialmente realizada através de métodos dispendiosos e morosos para as análises de rotina, tais como, métodos colorimétricos (método do Biureto e de Lowry), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE), cromatografia de filtração em gel entre outros (HARASZI., *et al.*, 2011). No entanto, métodos imunológicos sensíveis e específicos para as proteínas do glúten foram

desenvolvidos, como o método imunológico de Skerritt & Hill (1990), o qual se baseia em um ensaio imunoenzimático “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA).

Este método foi desenvolvido por Skerritt & Hill (SKERRITT & HILL, 1990) e se baseia na detecção da fração termoestável das gliadinas ( $\omega$ -gliadinas) por anticorpos monoclonais não sendo, portanto, a extractabilidade e imunorreatividade influenciadas pelo fato do alimento ser processado termicamente. A desvantagem do método é que o mesmo detecta apenas uma pequena percentagem da totalidade de gliadinas, variando a proporção da fração  $\omega$  (6 a 20% das gliadinas totais) conforme o tipo de cereal. Com isso existe um risco de subestimar ou superestimar o teor total de gliadinas, dependendo da composição do produto em relação ao padrão de controle. Outra desvantagem relacionada às outras prolaminas é o fato deste ensaio superestimar as secalinas e subestimar as hordeínas (SKERRITT & HILL, 1990).

### **3.1 – Técnicas moleculares para detecção de glúten em alimentos**

Atualmente, técnicas baseadas na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) têm sido aplicadas por serem mais sensíveis e rápidas quando comparadas a outros métodos. Sequências específicas de oligonucleotídeos iniciadores relacionadas a um determinado alvo são utilizadas nesta técnica, fazendo com que haja uma maior especificidade e portanto um resultado mais confiável. Esta técnica é aplicada qualitativamente e quantitativamente em tempo real, como descrito a seguir.

#### **3.1.1 – PCR qualitativa**

A tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) é baseada nos princípios da replicação do DNA fita dupla, o mecanismo responsável pela transmissão da informação genética nas células (DE BARROS; OLIVEIRA; MARIN, 2008).

Trechos de DNA genômico podem ser amplificados *in vitro* sob condições específicas nas quais são adicionados ao meio reacional oligonucleotídeos curtos (*primers*) ou iniciadores (apresentando sequência de bases complementar ao DNA molde), DNA polimerase termoestável, tampão da DNA polimerase, desoxinucleotídeos (dNTP) e cloreto de magnésio (co-fator para a DNA polimerase).

Ciclos dessa reação produzem fragmentos de DNA de sequências específicas, mesmo a partir de traços de DNA molde (em 3 horas, obtém-se, aproximadamente,  $10^9$  cópias). A Figura 2 representa esquematicamente o princípio da técnica de PCR (MEYER, 1999).

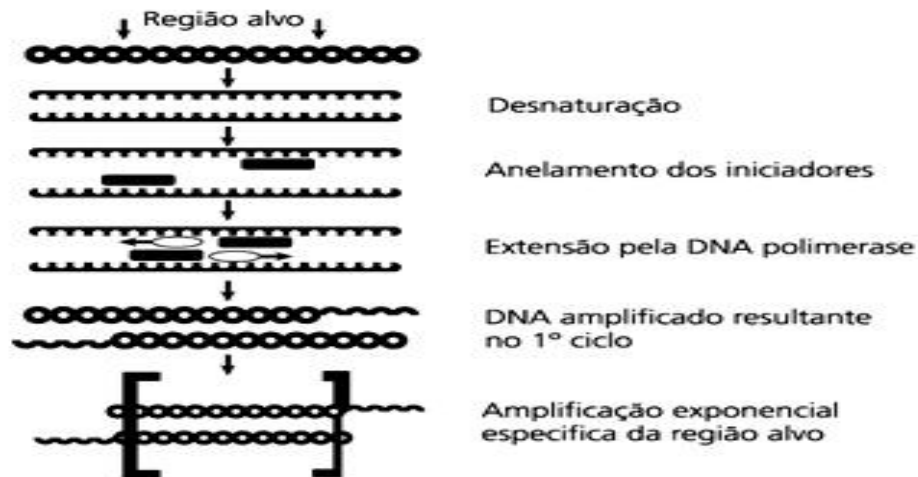


Figura 2: Representação esquemática do princípio da técnica de PCR. (MEYER, 1999).

A reação é conduzida com ciclos de amplificação, com desnaturação do DNA a  $95^{\circ}\text{C}$ , por tempo específico, anelamento dos iniciadores e extensão, ambos em temperatura e tempo específicos.

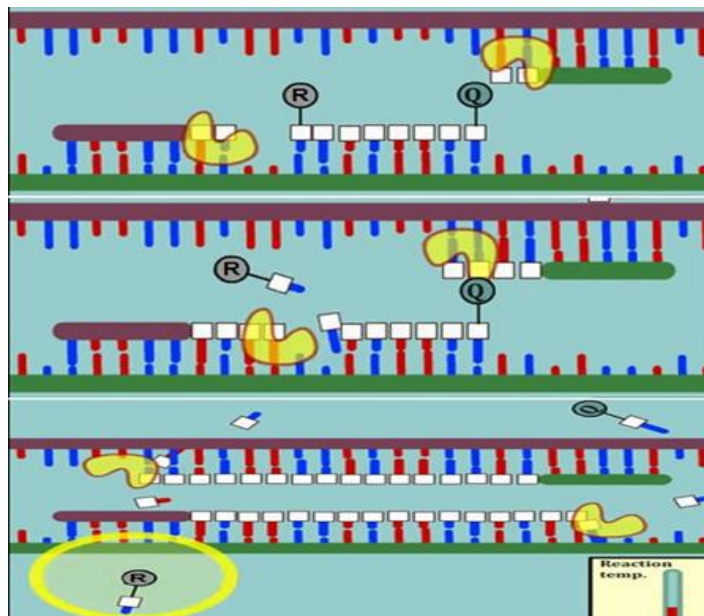
### 3.1.2 – PCR em tempo real

A técnica de q-PCR permite o monitoramento da reação de amplificação em tempo real (ciclo a ciclo) em sistema fechado sem interferências externas no progresso da reação. Um sinal fluorescente é detectado em proporção ao aumento da quantidade do produto de amplificação. Essa fluorescência é emitida por compostos fluoróforos que podem estar ligados a sondas (Taqman) ou intercalados na dupla fita do DNA amplificado (SYBR Green).

As sondas são sequências de DNA que se ligam à região central da sequência alvo, aumentando a seletividade do método. É marcada na extremidade 5' com um corante *reporter* fluorescente de alta energia e um corante *quencher* fluorescente de baixa energia na extremidade 3'. Enquanto a sonda permanece intacta, a proximidade do *quencher* reduz intensamente a fluorescência emitida pelo *reporter*.



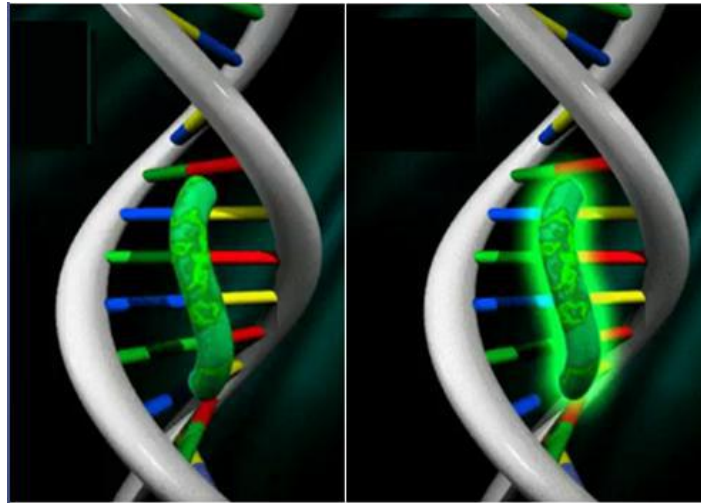
pela transferência de energia tipo FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Na presença do alvo, durante a fase de anelamento da reação de PCR, a sonda se anela em uma das fitas do DNA alvo no sentido *downstream* a um dos sítios do iniciador. Durante a fase de extensão, a atividade de exonuclease 5' → 3' da enzima *Taq*DNA polimerase degrada a sonda ocorrendo liberação do corante *reporter* e emissão do sinal fluorescente (BRANQUINHO, 2010). O esquema pode ser visto na Figura 3 (REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION, 2010).



**Figura 3: Representação da ação da TaqDNA polimerase na sonda TaqMan durante a fase de extensão da q-PCR (REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION, 2010).**

Outro sistema de detecção utilizado consiste no uso do corante intercalante, o chamado SYBR Green I. Este se liga inespecificamente à dupla fita de DNA, não se ligando à fita simples. À medida que a q-PCR vai ocorrendo, o aumento da quantidade do DNA sintetizado resulta em um aumento do sinal fluorescente. A maior limitação deste sistema é a inespecificidade, já que toda fita dupla de DNA formada, incluindo os produtos não específicos e os artefatos de dímeros de iniciadores, é quantificada. Para superar essa limitação, deve ser feita uma análise posterior através da curva de dissociação térmica dos produtos resultantes da

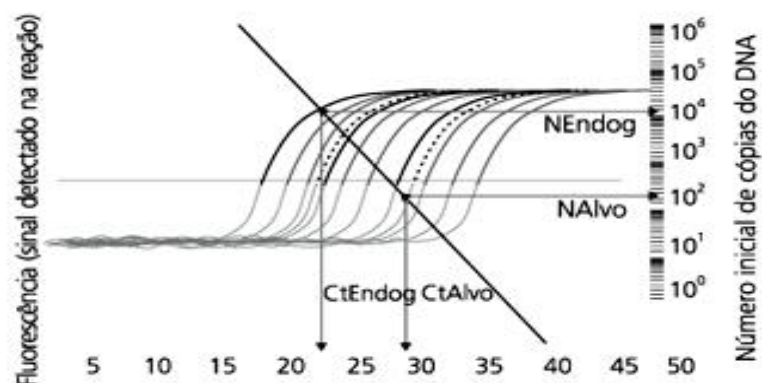
amplificação (WEIGHARDT, 2004). Na Figura 4 esta representada a ação do corante intercalante SYBR Green na dupla fita de DNA formada após q-PCR.



**Figura 4: Representação da ação do corante SYBR Green na dupla fita de DNA formada após q-PCR (HOW SYBR WORKS, 2008).**

Apesar das vantagens da técnica de PCR em tempo real, esta ainda apresenta custo elevado e requer treinamento especializado (WISEMAN, 2002).

No computador que está acoplado ao termociclador no qual ocorre a PCR, cada reação de amplificação é mostrada com uma linha, o esquema pode ser visto na Figura 5 (TERRY; HARRIS; PARKES, 2002).



**Figura 5: Amplificação em PCR quantitativo em tempo real. (TERRY; HARRIS; PARKES, 2002).**

A fluorescência emitida em resposta à síntese do produto de amplificação é detectada em tempo real. Com o progresso da reação, pode se observar um aumento do sinal emitido (fase exponencial). Quando esse aumento da fluorescência passa a ser estatisticamente significativo, atinge-se o nível *threshold* (linha horizontal), o ciclo da PCR correspondente é chamado ciclo *threshold* (Ct).

Diante deste cenário, alguns trabalhos foram relatados com a aplicação de PCR para a detecção das sequências de DNA das prolaminas presentes nos cereais. Desde 2001, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos no que tange a aplicação de PCR para a detecção de glúten. Os resultados demonstram uma correlação entre o método imuno-enzimático (ELISA) e a PCR, com um diferencial relativo ao menor tempo de análise (DAHINDEN, von BÜREN, LÜTHY, 2001; OLEXOVÁ *et al.*, 2006; PIKNOVÁ, BREŽNÁ, KUČHTA, 2008; GÉLINAS *et al.*, 2008). Adicionalmente, os kits comerciais baseados em ELISA, não detectam glúten de aveia (ZELTNER, GLOMB, MAEDE, 2009).

A PCR em tempo real (q-PCR), usando o sistema SYBR Green e o sistema TaqMan (sondas FRET), tem apresentado resultados promissores em relação ao tempo de análise e a sensibilidade, ou seja, menor limite de detecção (SANDBERG *et al.*, 2003; TERZI *et al.*, 2004). O desafio para o desenvolvimento de um método baseado em PCR para a detecção de glúten é o desenho de par de primers/sondas que se hibridize a uma região homóloga das prolaminas de todas as fontes de glúten.

## IV – MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 1 – Utilização de ferramentas de bioinformática na construção de *primers* para detecção de sequências específicas de DNA

A especificidade de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*) é fundamental para o sucesso da Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR). Sendo assim, a bioinformática é imprescindível para a manipulação de dados biológicos. Ela pode ser definida como uma modalidade que abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica. Através da combinação de procedimentos e técnicas de matemática, estatística e ciência da computação são elaboradas várias ferramentas que nos auxiliam a compreender o significado biológico representado nos dados genômicos. Além disso, através da criação de banco de dados com as informações já processadas, acelera a investigação em áreas como medicina, biotecnologia, agronomia e etc. (QU *et al.*, 2008).

No presente trabalho utilizaram-se as ferramentas de bioinformática para construção das sequências de primers de interesse através do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*); *Clustal W*; *Gene Fisher* e por fim o programa *Bioinfo*, que simula a Reação em Cadeia da DNA Polimerase *in silico*. Tais ferramentas são essenciais para se atingir o sucesso no desenho de iniciadores específicos para uso na PCR convencional e PCR em tempo real.

### 2 – Alimentos analisados

Alimentos rotulados como “contém glúten”; “não contém glúten” e alimentos “naturalmente livres de glúten” foram adquiridos aleatoriamente em estabelecimentos comerciais do município do Rio de Janeiro. Os produtos foram respectivamente: amido de milho, creme de arroz, farinha de trigo, mistura para bolo, farinha de mandioca e arroz integral. Todo o conteúdo da embalagem dos produtos foi homogeneizado individualmente por agitação mecânica, dos quais foram obtidos alíquotas de 100mg para proceder à extração de DNA. Amostras de aveia, centeio,

cevada e trigo, também foram utilizadas para testar os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados neste trabalho.

### **3 – Extração do DNA genômico**

A etapa de extração de DNA é fundamental na execução das análises subsequentes, sendo necessária máxima eficiência para confiabilidade dos resultados. A eficiência da extração de DNA e sua pureza são fatores determinantes do sucesso da análise por PCR. Em geral, o DNA isolado a partir de alimentos processados é altamente degradado, e precisa ser isolado de lipídeos, proteínas, polissacarídeos e sais, pois estes poderiam exercer efeito inibitório sobre a enzima DNA polimerase (Meyer, 1999; Terry *et al.*, 2002).

As amostras selecionadas foram submetidas à extração de DNA genômico com a utilização do método híbrido CTAB/DNeasy, que faz uso do detergente iônico brometo de cetil-trimetil-amônio (CTAB) como tampão de extração e, se baseia na lise celular através de tampão de lise seguida de precipitação das proteínas e polissacarídeos que são, posteriormente, removidos por uma coluna com resina de sílica ligante de DNA do kit DNeasy (Qiagen). As etapas que constituem tal método encontram-se em anexo. O DNA isolado foi quantificado por espectrofotometria UV, pela leitura de absorbância a 260nm.

### **4 – PCR qualitativa para avaliação dos iniciadores referentes a este trabalho.**

Os oligonucleotídeos desenhados neste trabalho foram sintetizados pela *Invitrogen Life Technologies*. O nome de cada oligonucleotídeo, suas sequências, os alvos específicos e o tamanho dos fragmentos esperados, encontram-se em anexo. A PCR qualitativa (convencional), foi conduzida em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystem*, com adição de 50ng de DNA molde (isolado das amostras avaliadas), ao MIX contendo: tampão PCR 1X (200 mM Tris-HCl pH 8.4; 500mM KCl), 3,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM desoxinucleotídeos (dNTP's), 500nM oligonucleotídeos iniciadores, 0.3 U/μL *Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen Life Technologies)*. O volume total da reação foi de 20μL, sendo 15 μL de

Mix e 5µL de DNA e as condições de ciclagem térmica foram: desnaturação inicial a 95°C por 10min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 50s; hibridização com temperatura variando entre 51,5°C e 71°C (dependente da sequência de oligonucleotídeos iniciadores) por 50s; polimerização a 72°C por 50s; extensão final a 72°C por 5min e resfriamento a 4°C.

## **5 – Detecção dos produtos da amplificação**

Os extratos de DNA obtidos a partir das amostras de interesse, além dos produtos obtidos a partir da técnica de PCR convencional, foram fracionados em eletroforese, a fim de separar e identificar os fragmentos de DNA resultantes.

Para o preparo do gel de agarose 2% (p/v) foram utilizados 50 mL de tampão TBE 1X (0,1 mM Tris-acetato; pH 8,4; 0,09 mM ácido bórico e 0,001 mM EDTA), preparado a partir da solução estoque 10x. A solução de agarose em TBE foi aquecida em microondas até completa dissolução do polímero. Após atingir a temperatura de aproximadamente 60°C, adicionou-se 2,5 µL de solução de brometo de etídio a 10 µg/mL, e o gel foi aplicado na cuba de eletroforese. Após certo tempo, tendo havido a polimerização do gel, o tampão de eletroforese foi despejado na cuba, quando então a amostra de DNA foi aplicada juntamente com o tampão corante blue juice e separadamente também aplicou-se o padrão de bases. A eletroforese foi realizada em aparelho *Power NPAC 300 (BioRad)* nas seguintes condições: 150 V, 150 mA, por 250 minutos.

Após a corrida, o gel foi visualizado e fotodocumentado em transiluminador sob luz UV, modelo ECX-20M, acoplado a sistema de documentação digital (*Vilber Lourmat*).

## **6 – Seleção dos iniciadores: Condições para PCR em tempo real por SYBR GREEN**

Para os oligonucleotídeos que apresentaram resultados positivos para os alvos (aveia, centeio, cevada e trigo) na PCR convencional foram conduzidas análises destes com os respectivos alvos através de PCR em tempo real para detecção de

glúten. Todas as análises foram desenvolvidas no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

A PCR em tempo real foi realizada em termociclador *ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem)*, com adição do kit SYBR Green® PCR Master MIX (1X) (*Applied Biosystem*), 40ng de DNA e 0,15µM de cada oligonucleotídeo iniciador. O volume total da reação foi de 20µL, sendo 16 µL correspondente ao Mix e 4µL de DNA. Os parâmetros de ciclagem térmica utilizados foram: ativação da enzima a 95°C por 10min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s, hibridização com temperatura variando entre 54° e 70°C por 1min e extensão a 72°C por 1min. Adicionalmente, foi conduzida uma etapa com três estágios para a construção da curva de dissociação, desnaturação a 95°C por 15s, amplificação em ciclos a 60°C por 20s seguida de elevação da temperatura de 95°C por 15s, o que permitiu a discriminação entre o sinal de fluorescência emitido pelos fragmentos amplificados e possíveis interferentes, tais como amplificados não específicos e dímeros de *primers*.

## **7 – Condições para PCR em tempo real usando o sistema TaqMan**

Para os oligonucleotídeos e sondas já validados por (CAO; XU; ZHENG, 2010), foram realizados testes usando as amostras de DNA isolados e já analisados pelo sistema SYBR Green. A reação foi conduzida em termociclador *ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem)*, com adição de 10ng de DNA, 0,3µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2µM sonda e *Taq Man® Universal PCR Master Mix 1X (Applied Biosystem)*. A fim de amplificar as sequências de interesse, foram utilizados oligonucleotídeos e sondas específicas para detectar a região de interesse em cada alvo, marcados com os fluoróforos *FAM (repórter)* e *TAMRA (quencher)*. As amostras de DNA isoladas das fontes de glúten (aveia, centeio, cevada e trigo) foram usadas nas reações para construção de curvas padrão. O volume total da reação foi de 20µL, sendo 19µL correspondente ao Mix e 1µL de DNA e as condições de ciclagem térmica foram: ativação da Polimerase a 95°C por 10min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 50s e hibridização com

temperatura variando entre 51,5°C e 71°C (dependendo da sequência dos *primers*/sondas) por 50s e extensão a 72°C por 1min.

A eficiência da reação de amplificação e o limite de detecção para cada par de *primers* foi estimada por meio de uma série de diluições das amostras de DNA isolado de aveia, centeio, cevada e trigo, resultando em diferentes concentrações (0.005; 0.05; 0.5; 5 e 50 ng/μL). Os valores de Ct (ciclo de “treshhold”) obtidos foram correlacionados, traçados, em função do logaritmo das diluições, e o coeficiente angular foi utilizado para calcular a eficiência (E) de cada sistema (composto pelo DNA alvo, os *primers* e a sonda), de acordo com a equação a seguir:

$$E (\%) = ([10^{-1/\text{coeficiente angular}}] - 1) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Estimou-se também o Limite de detecção através da seguinte equação:

$$\text{LOD (ng/}\mu\text{L)} = 3 \times \sigma_{(\text{da menor concentração detectada})} \quad \text{Equação 2}$$

Todas as reações foram realizadas em duplicata e utilizou-se água Milli-Q como controle negativo a fim de avaliar possível contaminação com DNA genômico.



## V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

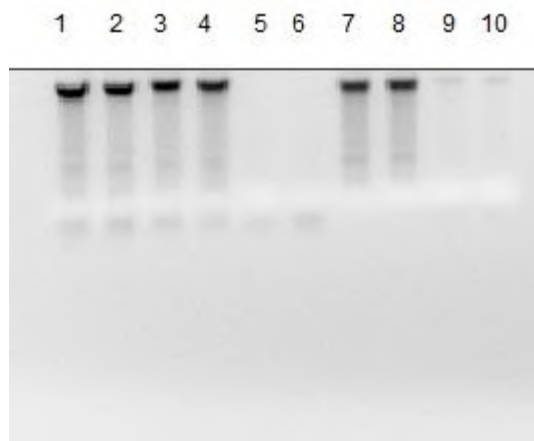
---

### 1 – Extração e purificação do DNA genômico – método híbrido CTAB/DNeasy

O DNA isolado das amostras (aveia, centeio, cevada, trigo, amido de milho, creme de arroz, farinha de trigo, mistura para bolo, farinha de mandioca, arroz integral) foi analisado por eletroforese em gel de agarose e as bandas foram visualizadas em transiluminador e fotodocumentadas (Figuras 4 e 5).

#### 1.1 – Extração e quantificação do DNA genômico – amostras fontes de glúten

A Figura 6 representa a fotodocumentação do gel obtido da extração de amostras fontes de glúten em duplicata.



**Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1,5% para análise do rendimento da extração do DNA (trigo (1 e 2); centeio (3 e 4); aveia (5 e 6); farinha de trigo (7 e 8); cevada (9 e 10)).**

As bandas dos poços 5 e 6 (aveia) e 9 e 10 (cevada) mostraram-se menos intensas que as demais; tal fato pode estar relacionado ao uso de diferentes matrizes havendo portanto diferença na eficiência da extração. Após esta análise inicial em gel de agarose das amostras de DNA, as mesmas foram diluídas para posterior quantificação por espectrofotometria com leitura a 260nm. Dessa forma, cevada, centeio, farinha de trigo e trigo foram diluídas 10X (26µL de amostra mais 234 µL de água Milli-Q) e aveia foi diluída 4X (65 µL de amostra mais 195 µL de água Milli-Q). Determinou-se, então, a concentração do DNA

espectrofotometricamente a partir dos dados de absorvância a 260nm e um fator de conversão (f) determinado previamente (concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)= absorvância x diluição x  $f^{-1}$ ), onde  $f= 0,009$ . Os resultados estão representados na tabela 1.

**Tabela 1: Quantificação após extração de DNA das amostras fontes de glúten.**

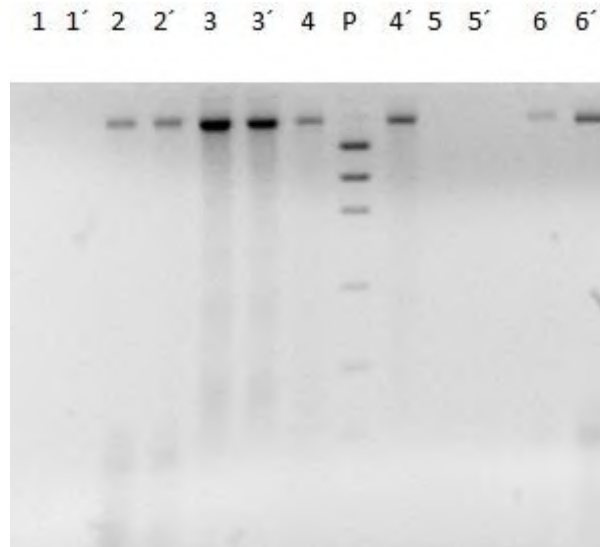
Amostras	Absorbância (260nm)	[DNA] (ng/ $\mu$ L)
Aveia	0,276	122,67
Centeio 1	0,254	282,22
Centeio 2	0,207	230,00
Cevada 1	0,087	96,67
Cevada 2	0,075	83,33
Farinha de trigo 1	0,225	250,00
Farinha de trigo 2	0,204	226,67
Trigo 1	0,339	376,67
Trigo 2	0,286	317,78

\*Os números nas amostras correspondem à duplicata de cada extração.

Após a determinação da concentração foi possível calcular a diluição necessária para que a quantidade inicial de DNA para condução de PCR qualitativa fosse de 50 ng.

## 1.2 – Extração e quantificação do DNA genômico – amostras comerciais

A Figura 7 representa a fotodocumentação do gel obtido da extração de amostras comerciais conduzida em duplicata.



**Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 2% para análise do rendimento da extração do DNA (amido de milho (1 e 1'); creme de arroz (2 e 2'); farinha de trigo (3 e 3'); mistura para bolo (4 e 4'); farinha de mandioca (5 e 5'); arroz integral (6 e 6') e P: padrão de bases – Low DNA Mass Ladder).**

As bandas dos poços 1 e 1' (amido de milho) e 5 e 5' (farinha de mandioca) mostraram-se menos intensas que as demais, fato este que pode estar relacionado ao rendimento da extração, bem como ao nível de processamento do alimento. A análise do gel permitiu, com a comparação da intensidade das bandas do padrão de bases, estimar para as bandas correspondentes a 2,4 e 6 a concentração de 16ng/ $\mu$ L. Para as bandas que apresentaram intensidade muito abaixo do padrão foi estimado que suas concentrações estão abaixo de 16ng/ $\mu$ L. A banda 3 (farinha de trigo) que se mostrou mais intensa, foi diluída 5X para posterior quantificação por espectrofotometria.

Determinou-se, então, a concentração do DNA espectrofotometricamente a partir dos dados de absorvância a 260nm e um fator de conversão (f) determinado previamente (concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)= absorvância x diluição x  $f^{-1}$ ), onde  $f=0,009$ . Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2: Quantificação após extração de DNA da amostra comercial.**

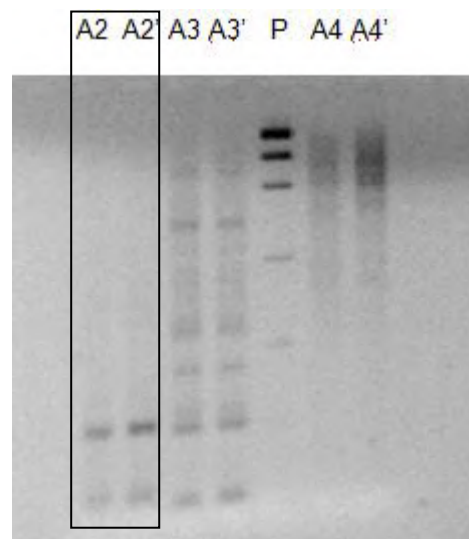
Amostra	Absorbância (260nm)	Concentração (ng/ $\mu$ L)
Farinha de trigo	0,341	189,44

Após a determinação da concentração, foi possível calcular a diluição necessária para que a quantidade inicial de DNA fosse de 50ng na condução da PCR.

## 2 – PCR qualitativa

A reação foi efetuada com as amostras fontes de glúten com intuito de testar os oligonucleotídeos iniciadores referentes desenhados e sintetizados durante o desenvolvimento deste trabalho. Cada par de *primers* foi testado com seu respectivo alvo. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 2% e as bandas obtidas foram fotodocumentadas.

A Figura 8 apresenta a fotodocumentação do gel obtido a partir do DNA produto de PCR qualitativa para diferentes oligonucleotídeos iniciadores com o mesmo alvo Avenina (amostra de aveia). A reação ocorreu em duplicata.

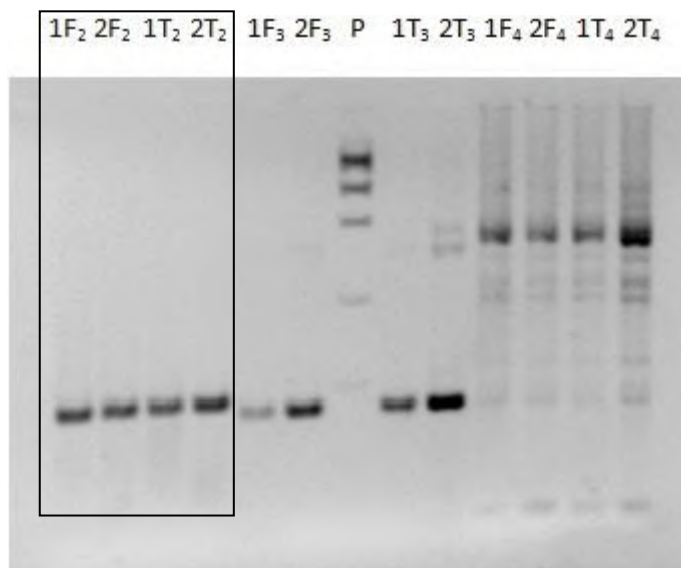


**Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2% para validação dos oligonucleotídeos iniciadores referentes ao alvo Avenina. (Primers da reação (A2, A3 e A4) com Aveia e padrão de bases (P)).**

Após análise do resultado, selecionou-se os *primers* A2 como os melhores para detecção de avenina em amostras de alimentos, pois, este apresentou amplificação (amplicon) com produtos de tamanho esperado (104pb).

Os testes para outros pares de *primers* para os seus respectivos alvos foram conduzidos.

A Figura 9 apresenta a fotodocumentação do gel obtido a partir do DNA produto de PCR qualitativo para diferentes oligonucleotídeos iniciadores com o mesmo alvo Gliadina (amostra de trigo). A reação se deu em duplicata.

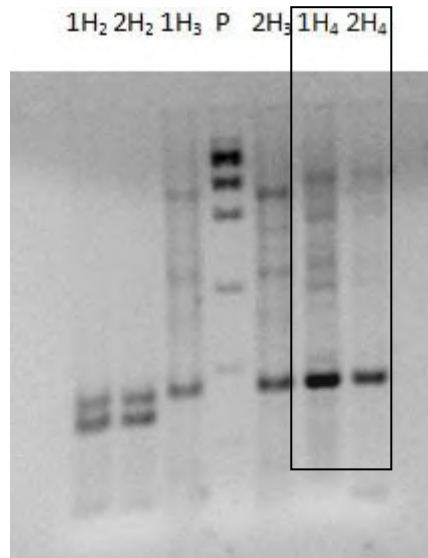


**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose 2% para validação dos oligonucleotídeos iniciadores referentes ao alvo Gliadina. (farinha de trigo (1F<sub>2</sub> e 2F<sub>2</sub>) com *primer* G2; trigo (1T<sub>2</sub> e 2T<sub>2</sub>) com *primer* G2; farinha de trigo (1F<sub>3</sub> e 2F<sub>3</sub>) com *primer* G3; trigo (1T<sub>3</sub> e 2T<sub>3</sub>) com *primer* G3; farinha de trigo (1F<sub>4</sub> e 2F<sub>4</sub>) com *primer* G4; trigo (1T<sub>4</sub> e 2T<sub>4</sub>) com *primer* G4 e padrão de bases(P)).

Após análise do resultado, selecionou-se o *primer* G2 como o melhor para detecção de Gliadina em amostras de alimentos. Pois este apresentou amplificação (amplicon) com produtos de tamanho (181pb) esperado, comparado com a corrida do padrão de bases.

Posteriormente, testaram-se os *primers* referentes ao alvo Hordeína.

A Figura 10 apresenta a fotodocumentação do gel obtido a partir do DNA produto de PCR qualitativo para diferentes oligonucleotídeos iniciadores com o mesmo alvo Hordeína (amostra de cevada). A reação ocorreu em duplicata.

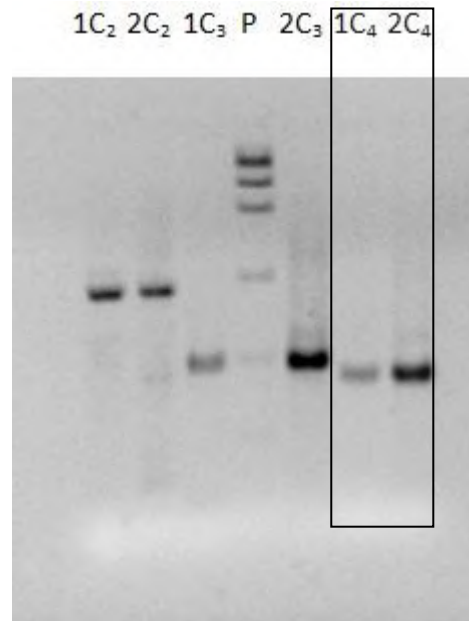


**Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 2% para validação dos oligonucleotídeos iniciadores referentes ao alvo Hordeína. (cevada (1H<sub>2</sub> e 2H<sub>2</sub>) com *primer* H2; cevada (1H<sub>3</sub> e 2H<sub>3</sub>) com *primer* H3; cevada (1H<sub>4</sub> e 2H<sub>4</sub>) com *primer* H4 e padrão de bases(P)).**

Após análise do resultado, selecionou-se o primer H4 como o melhor para detecção de Hordeína em amostras de alimentos, pois, este apresentou amplificação (amplicon) com produtos de tamanho esperado (167pb), comparado com a corrida do padrão de bases.

Finalmente, fez-se o teste para validação com os *primers* para Secalina (amostra de centeio).

A Figura 11 apresenta a fotodocumentação do gel obtido a partir do DNA produto de PCR qualitativo para diferentes oligonucleotídeos iniciadores com o mesmo alvo Secalina (amostra de centeio). A reação ocorreu em duplicata.



**Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 2% para validação dos oligonucleotídeos iniciadores referentes ao alvo Secalina. (centeio (1C<sub>2</sub> e 2C<sub>2</sub>) com *primer* S2; centeio (1C<sub>3</sub> e 2C<sub>3</sub>) com *primer* S3; centeio (1C<sub>4</sub> e 2C<sub>4</sub>) com *primer* S4 e padrão de bases(P)).**

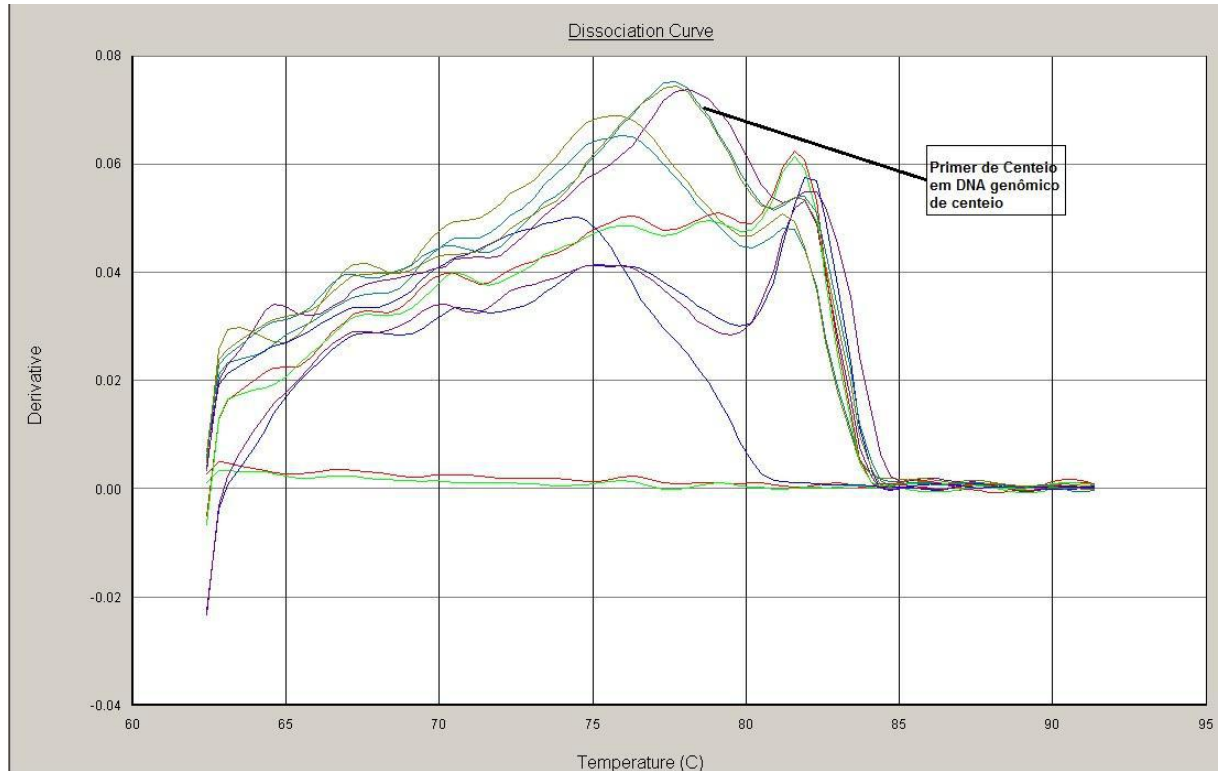
Após análise do resultado, selecionou-se o primer S4 como o melhor para detecção de Secalina em amostras de alimentos, pois, este apresentou amplificação (amplicon) com produtos de tamanho esperado (168 pb), comparado com a corrida do padrão de bases.

### **3 – PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green**

Após teste dos oligonucleotídeos referentes a este trabalho por PCR qualitativo, selecionou-se os que obtiveram melhor resultado (A2, G2, H4 e S4), no caso os que tiveram o amplicon mais próximo do esperado, para serem avaliados por PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green. No entanto, não houve amplificação específica e após algumas tentativas com intuito de otimizar a reação, como por exemplo, utilizar diferentes concentrações de DNA e de oligonucleotídeos iniciadores, e ainda utilizar diferentes T<sub>m</sub>'s, ficou evidente que seria necessário o desenho de outros oligonucleotídeos para a utilização do sistema SYBR Green.

Este fato pode ser observado através de alguns resultados obtidos após aplicação de PCR em tempo real (q-PCR) usando o sistema SYBR Green.

A Figura 12 apresenta a Curva de Dissociação obtida a partir da reação do iniciador S4 com diferentes fontes de glúten.

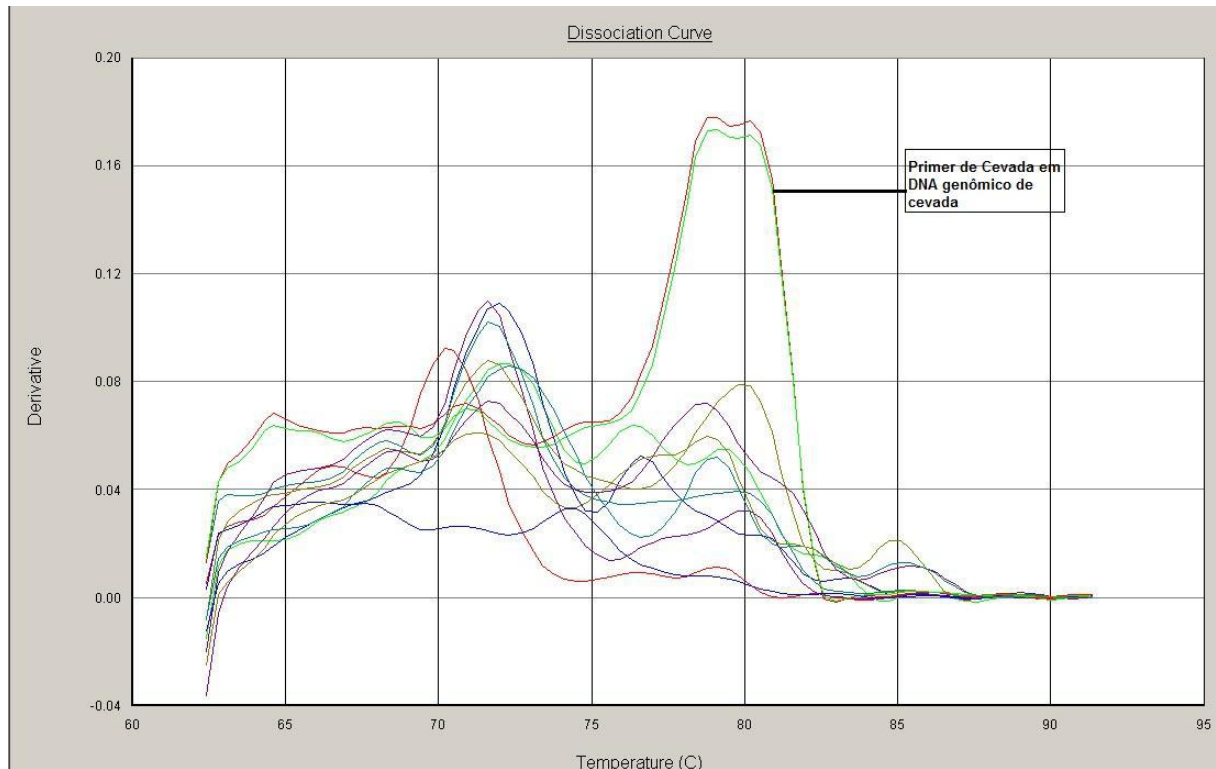


**Figura 12: Curva de Dissociação das amostras fontes de glúten (aveia, centeio, cevada, trigo) após PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green com o iniciador do alvo Secalina.**

Como visto na Figura 10, o resultado da reação com o oligonucleotídeo testado só foi considerável nas reações de PCR qualitativo.

A Figura 13 representa a Curva de Dissociação obtida a partir da reação do iniciador H4 com diferentes fontes de glúten.





**Figura 13: Curva de Dissociação das amostras fontes de glúten (aveia, centeio, cevada, trigo) após PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green com o iniciador do alvo Hordeína.**

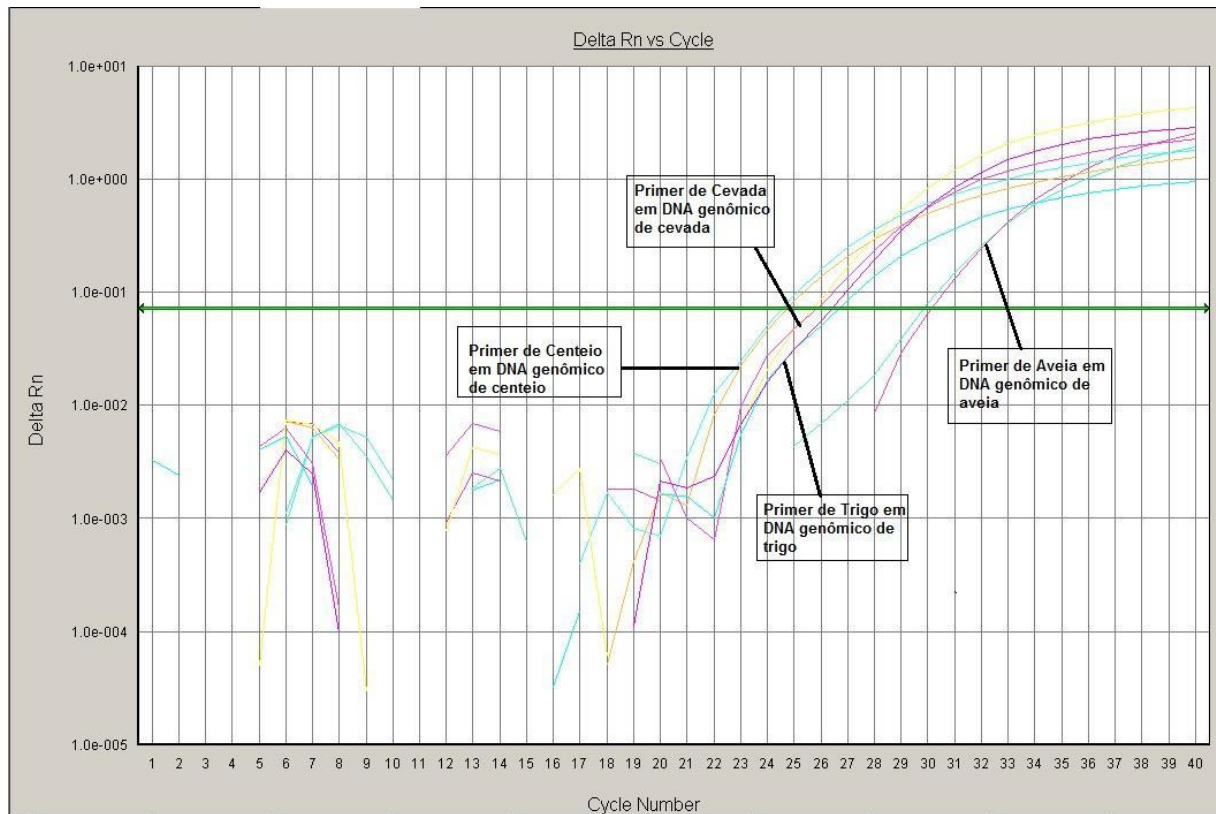
Este mesmo teste de especificidade do *primer* selecionado foi repetido para os demais, porém em nenhum foi encontrado resultado satisfatório.

De acordo com os resultados que foram apresentados, deu-se prosseguimento ao estudo, *primers* e sondas descritas por pesquisadores chineses (CAO; XU; ZHENG, 2010) foram testadas.

#### **4 – PCR em tempo real usando o sistema TaqMan**

Dando continuidade aos testes de validação, testou-se os oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas sondas já validadas de acordo com CAO; XU; ZHENG (2010) com o DNA de amostras de alimentos fontes de glúten (aveia, centeio, cevada e trigo).

Na Figura 14 estão apresentadas as curvas de amplificação após PCR em tempo real (q-PCR) com os *primers* (A1F, A1R; G1F, G1R; H1F, H1R e S1F, S1R) e suas respectivas sondas (A1P, G1P, H1P e S1P), com seus respectivos alvos.



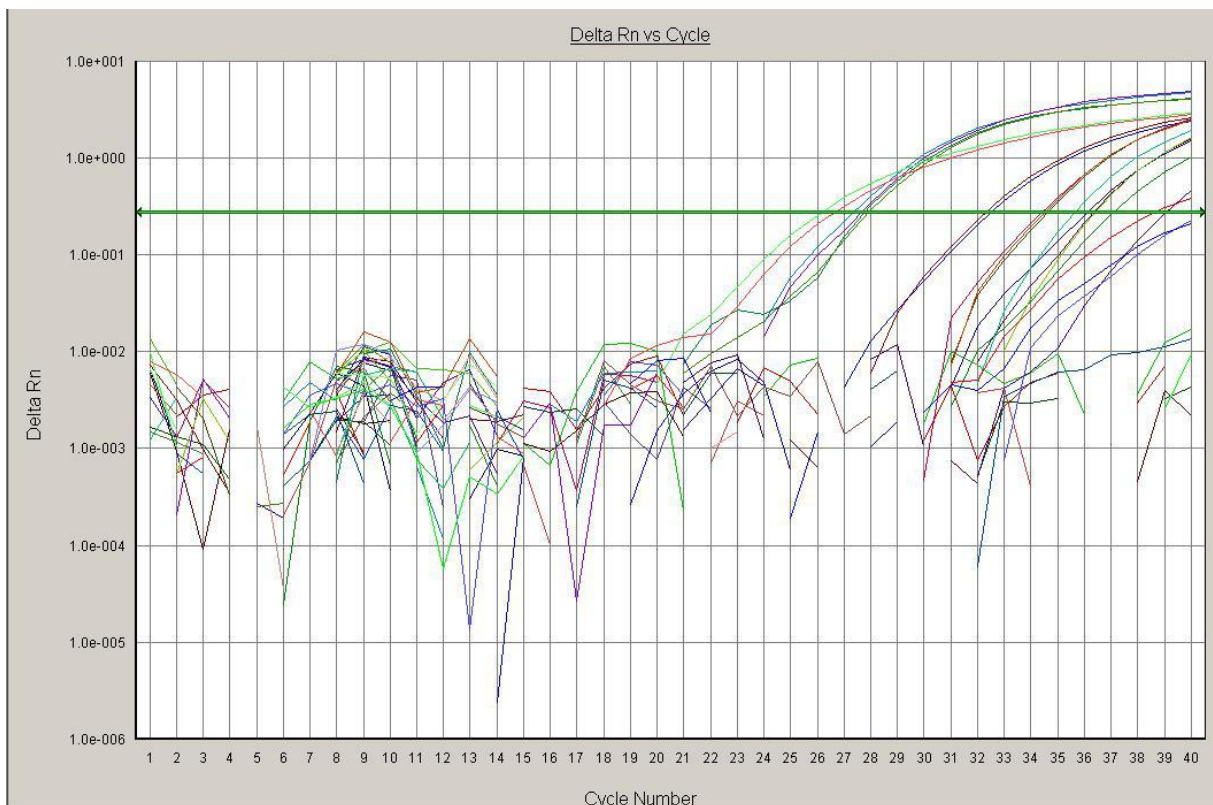
**Figura 14: Curva de Amplificação após q-PCR com os primers e sondas para as amostras fontes de glúten (aveia, centeio, cevada, trigo) em duplicata.**

De acordo com estes resultados, verificou-se que amplificações ocorreram com todos os *primers* e sondas testados com seus respectivos alvos (*primer* para Avenina amplificando com aveia; *primer* para Secalina amplificando com centeio; *primer* para Hordeína amplificando com cevada e *primer* para Gliadina amplificando com trigo).

#### 4.1 – Teste de especificidade dos *primers*

Cada par de *primer* com suas respectivas sondas foram testados com todas as amostras fontes de glúten, para verificar a especificidade da amplificação na reação.

Preparou-se para cada par de primer uma mistura com sua sonda correspondente e o DNA das amostras fonte de glúten foram aplicados em cada uma das misturas. As reações ocorreram em duplicata e como controle negativo utilizou-se água Milli-Q. A Figura 15 a seguir representa a curva de amplificação obtida após a reação de cada oligonucleotídeo iniciador e sondas com todas as amostras fontes de glúten.



**Figura 15: Curva de Amplificação após q-PCR com *primers* e sondas para as amostras fontes de glúten (aveia, centeio, cevada, trigo) para o teste de especificidade.**

Todos os genes alvos amplificaram com seus *primers*/sondas. Após condução das reações para o teste de seletividade, verificou-se que as amostras contendo DNA de centeio apresentaram amplificação com todos os *primers*/sondas testados. Embora o Ct das curvas de amplificação do DNA de centeio com os outros *primers*/sondas tenha sido muito superior ao apresentado pelo seu par específico, esse resultado demonstra que os pares de *primers*/sonda para detecção de outras fontes de glúten foram desenhados numa região muito homóloga ao gene da

secalina (centeio). Outras corridas foram conduzidas com alterações nas concentrações de *primers*/sonda e temperatura de anelamento ( $T_m$ ), mas as amplificações do DNA de centeio com *primers* para outras fontes sempre apareceram. Outra explicação para tais amplificações não seletivas é o fato da amostra de centeio ter sido adquirida no mercado, na forma de farinha de centeio. O que pode representar uma amostra com traços de glúten de outras fontes.

#### 4.2 – Curva Padrão, Limite de Detecção e Eficiência da Reação

A eficiência da q-PCR para os *primers* e sondas testados é um parâmetro crucial na confiabilidade dos resultados e, portanto, foi utilizada como critério para se avaliar o desempenho do método utilizado. A partir de diluições seriadas de 0,005; 0,05; 0,5; 5 e 50 ng/ $\mu$ L das amostras de DNA das fontes de glúten, foram conduzidas q-PCR com seus respectivos *primers* e sondas, para construção de curvas padrão, que estão representadas nas Figuras 16 a 19.

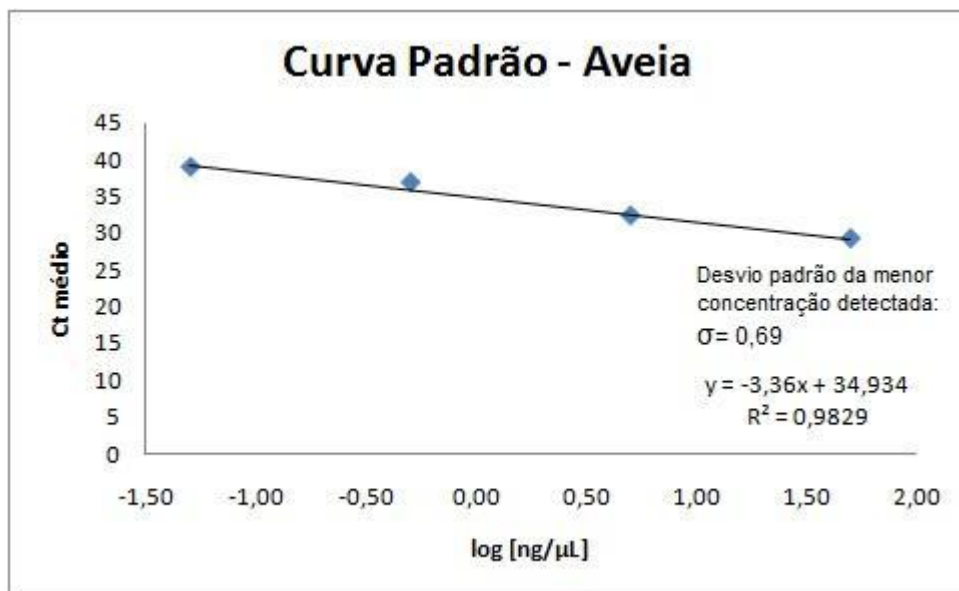


Figura 16: Curva Analítica obtida com o log das concentrações da amostra de aveia e o Ct médio em cada concentração, utilizando os iniciadores A1F, A1R e sonda A1P.

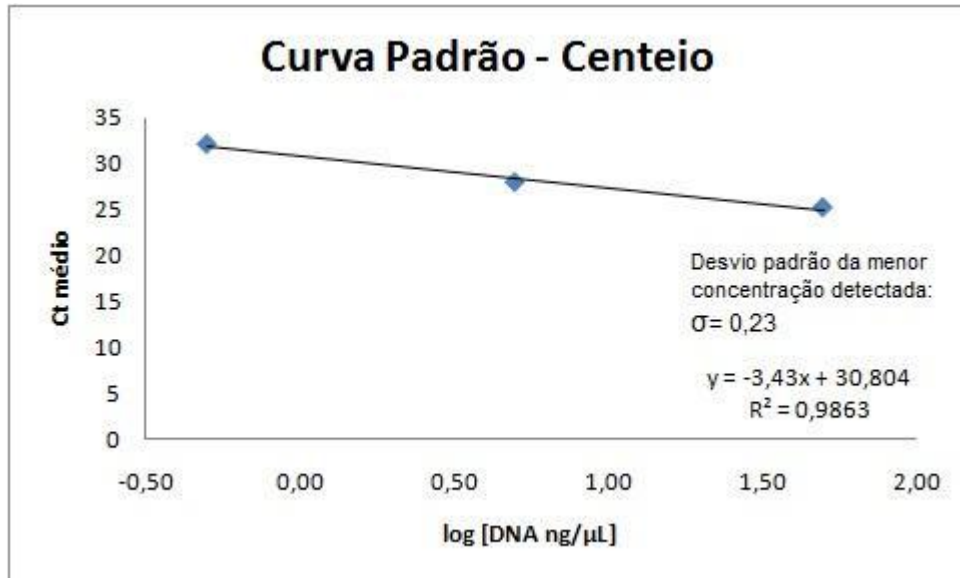


Figura 17: Curva Analítica obtida com o log das concentrações da amostra de centeio e o Ct médio em cada concentração, utilizando os iniciadores S1F, S1R e sonda S1P.

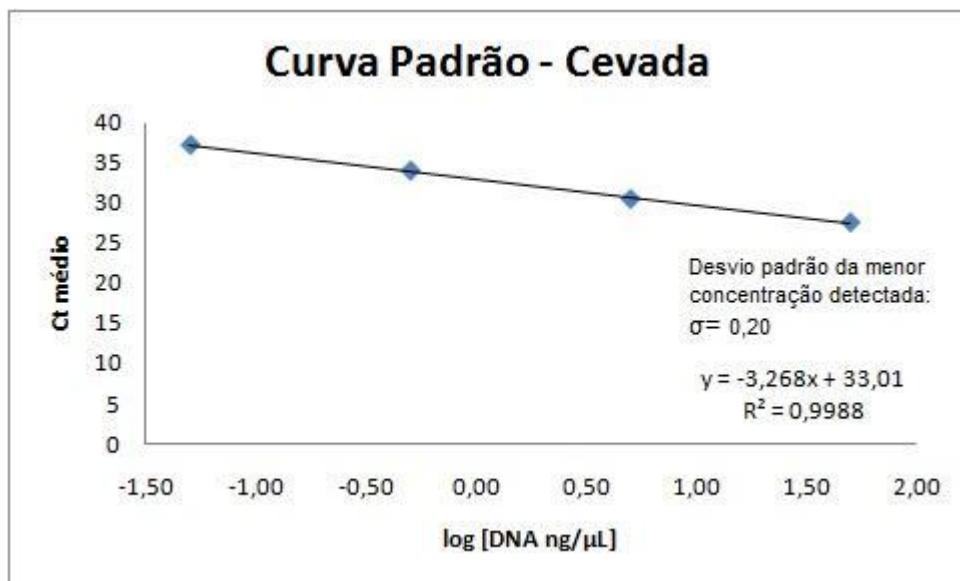
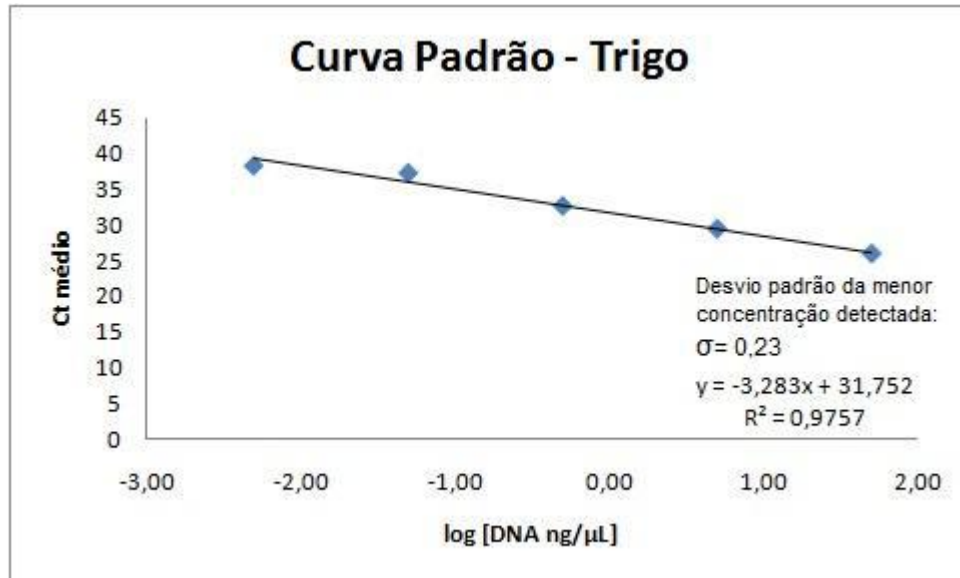


Figura 18: Curva Analítica obtida com o log das concentrações da amostra de cevada e o Ct médio em cada concentração, utilizando os iniciadores H1F, H1R e sonda H1P.



**Figura 19: Curva Analítica obtida com o log das concentrações da amostra de trigo e o Ct médio em cada concentração, utilizando os iniciadores G1F, G1R e sonda G1P.**

A partir de todos os gráficos acima, foi possível calcular o limite de detecção e a Eficiência da reação utilizando o coeficiente angular e o desvio padrão ( $\sigma$ ). A inclinação da reta (coeficiente angular) indica a eficiência da amplificação para ambos os alvos. Nas quatro curvas os valores variaram entre -3,27 a -3,43 correspondendo de 98% a 102% de eficiência. O Limite de Detecção se refere à menor quantidade de alvo que pode ser detectado com confiabilidade. Vale ressaltar também o papel do coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ), que demonstra o grau de correlação entre as concentrações e o Ct médio resultante da amplificação dos alvos. Os valores obtidos nas curvas variaram de 0,976 a 0,998. A Tabela 3 apresenta os valores de LOD e Eficiência da reação para cada experimento realizado.

**Tabela 3: Limite de Detecção e Eficiência da Reação calculados a partir dos resultados obtidos na curva padrão da q-PCR.**

DNA alvo	LOD (ng/ $\mu$ L)	Eficiência (%)
Avenina (aveia)	2,08	98,44
Secalina (centeio)	0,68	95,68
Hordeína (cevada)	0,59	102,30
Gliadina (trigo)	0,68	101,65

\*LOD: Limite de Detecção

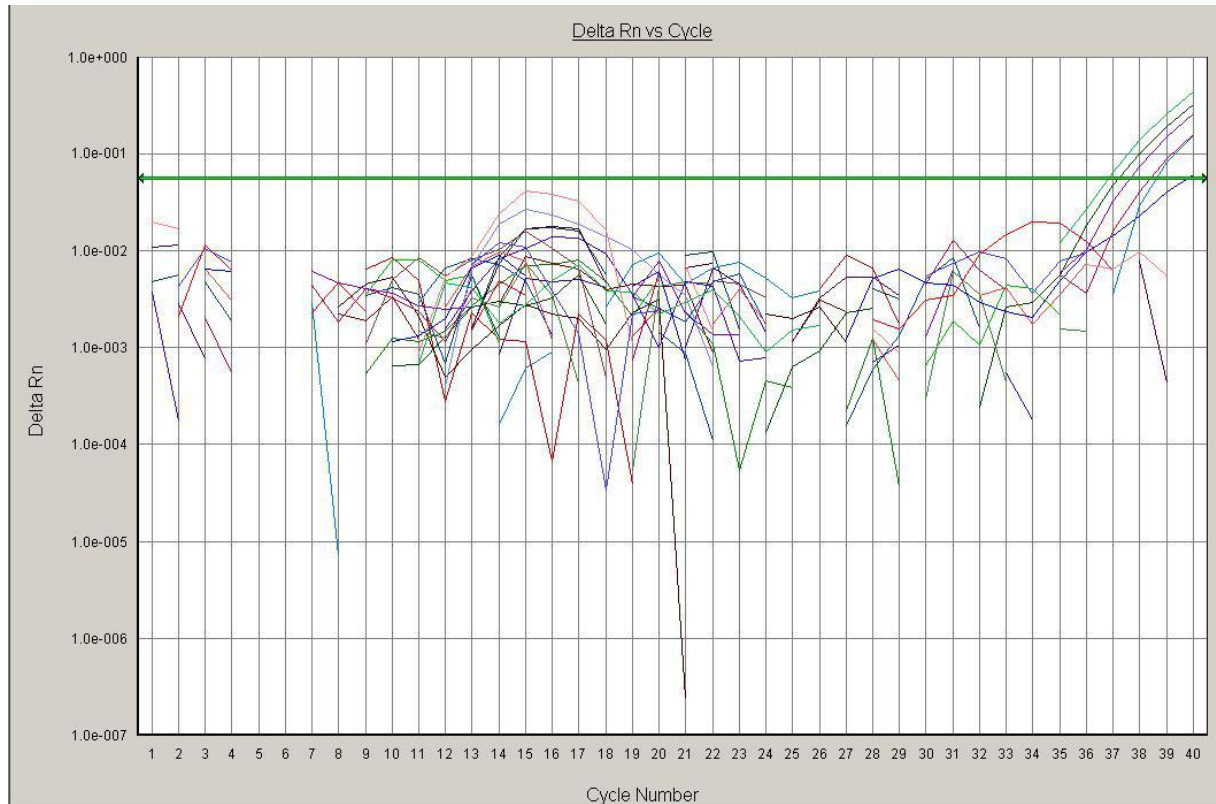
A partir dos dados da Tabela 3, pode-se dizer que os oligonucleotídeos iniciadores juntamente com suas sondas que apresentam uma maior sensibilidade na detecção dos genes alvo (Secalina, Hordeína e Gliadina), são respectivamente, S1F e S1R com S1P; H1F e H1R com H1P, G1F e G1R com G1P. Com o uso destes fica possível detectar concentrações do gene alvo de no mínimo 0,59 ng/ $\mu$ L (hordeína) e 0,68 ng/ $\mu$ L (secalina e gliadina). No entanto, o par de *primers* e sonda para o gene alvo Avenina foi o de menor sensibilidade na detecção, sendo possível detectar até 2,08 ng/ $\mu$ L do gene de interesse. Sendo assim, se houver concentrações de gene alvo abaixo do Limite de Detecção não será possível afirmar que tal gene está ausente na amostra de DNA analisada.

É importante ressaltar que nos relatos da literatura a eficiência das reações varia de 94 a 106% (PIKNOVÁ, BREZNÁ, KUČHTA, 2008; TERZI *et al.*, 2004).

#### **4.3 – Análise de alimentos processados quanto à presença de glúten.**

Após estabelecido o LOD e Eficiência da Reação, foram realizadas análises de q-PCR com alimentos designados “livre de glúten” (amido de milho e creme de arroz), “contém glúten” (farinha de trigo e mistura para bolo) e os naturalmente livre de glúten (farinha de mandioca e arroz integral). Cada amostra de alimento foi analisada através de q-PCR com todos os pares de oligonucleotídeos iniciadores e sondas para a detecção das diferentes fontes de glúten (Figuras 20, 21 e 22). Cada

Figura é seguida de uma Tabela que apresenta os dados da curva de amplificação (Ct).



**Figura 20: Curva de Amplificação após q-PCR para as amostras designadas “livre de glúten” (amido de milho e creme de arroz) utilizando os iniciadores e sondas validados por CAO; XU; ZHENG (2010).**

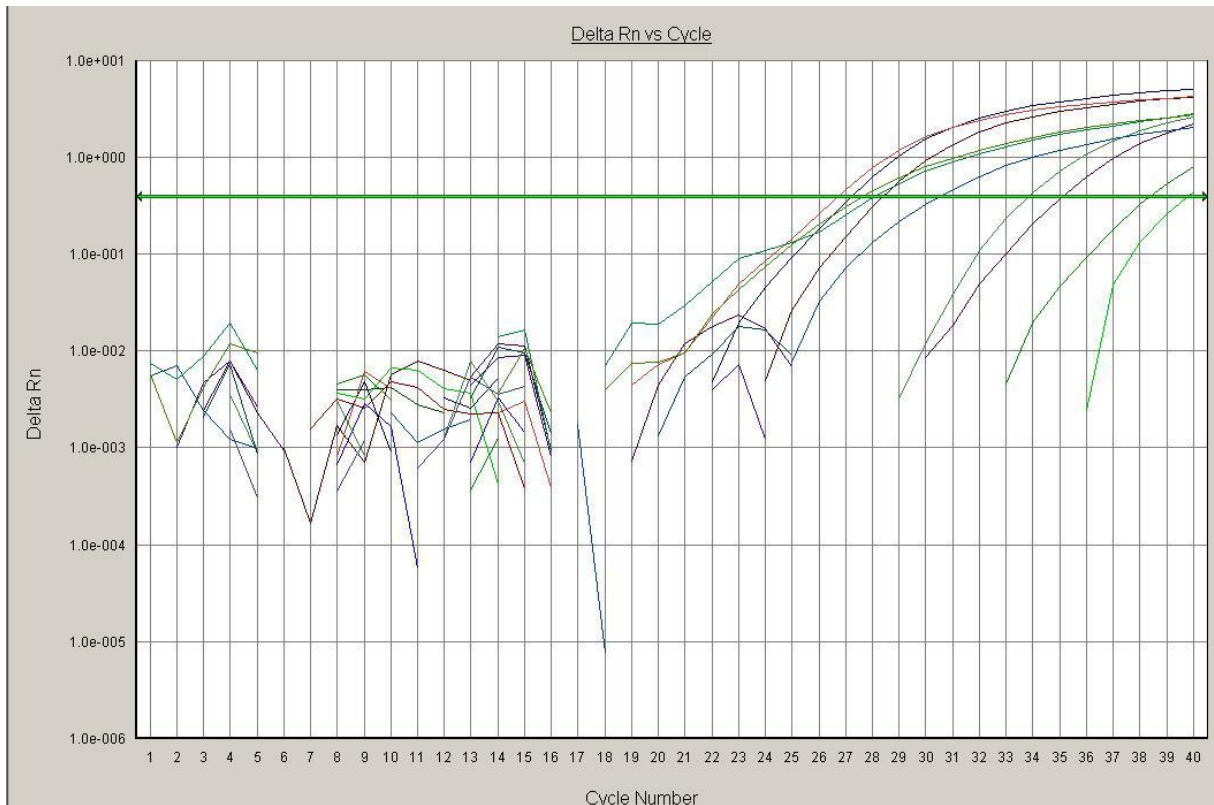


**Tabela 4: Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação após q-PCR para amostras “livre de glúten”.**

<b>Amostras</b>	<b>DNA alvo</b>	<b>Ct1</b>	<b>Ct2</b>	<b>Ct médio</b>
Amido de milho	Avenina	Ind	Ind	Ind
	Gliadina	Ind	Ind	Ind
	Hordeína	36,79	38,35	37,57
	Secalina	Ind	Ind	Ind
Creme de arroz	Avenina	Ind	Ind	Ind
	Gliadina	Ind	Ind	Ind
	Hordeína	38,53	37,60	38,07
	Secalina	Ind	Ind	Ind

\* Ind (indeterminado): não ocorreu amplificação.

A amostra de amido de milho não apresentou amplificação até o Ct 40 para os alvos avenina, gliadina e secalina, confirmando a ausência de genes específicos ao glúten. Porém, para hordeína ocorreu amplificação em Ct alto o que pode ser contaminação cruzada causada no campo por rotação de cultivos diferentes ou durante o processamento onde o alimento pode ter entrado em contato com o equipamento que estaria impróprio para utilização, não sendo devidamente higienizado antes de ser utilizado. O mesmo ocorre para a amostra de creme de arroz em hordeína, que amplificou e apresentou um Ct alto, que indica contaminação.



**Figura 21: Curva de Amplificação após q-PCR para as amostras designadas “contém glúten” (farinha de trigo e mistura para bolo) utilizando os iniciadores e sondas validados por CAO; XU; ZHENG (2010).**

**Tabela 5: Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação após q-PCR para amostras “contém glúten”.**

Amostras	DNA alvo	Ct1	Ct2	Ct médio
farinha de trigo	Avenina	Ind	Ind	Ind
	Gliadina	26,67	27,71	27,21
	Hordeína	32,09	32,83	32,46
	Secalina	28,74	29,47	29,11
mistura para bolo	Avenina	36,36	36,92	36,64
	Gliadina	27,19	26,67	26,93
	Hordeína	34,31	34,84	34,58
	Secalina	28,13	27,64	27,89

\*Ind (indeterminado): não ocorreu amplificação.

Ocorreu amplificação para todas as amostras, exceto para farinha de trigo em avenina. O que provavelmente indica que não há avenina na amostra de farinha de trigo, mas as demais proteínas características do complexo glúten estão presentes. Para a amostra de mistura para bolo em avenina ocorreu amplificação em Ct alto, o que pode ser uma contaminação e não necessariamente significa que avenina faça parte da composição desta amostra. Por fim, todas as amplificações que ocorreram para os alvos avenina, gliadina, hordeína e secalina, confirmam a presença de genes específicos ao glúten.



**Figura 22: Curva de amplificação após q-PCR para amostras designadas naturalmente livres de glúten.**

**Tabela 6: Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação após q-PCR para amostras naturalmente livres de glúten.**

<b>Amostras</b>	<b>DNA alvo</b>	<b>Ct1</b>	<b>Ct2</b>	<b>Ct médio</b>
Arroz integral	Avenina	Ind	Ind	Ind
	Gliadina	Ind	Ind	Ind
	Hordeína	Ind	Ind	Ind
	Secalina	Ind	Ind	Ind
Farinha de mandioca	Avenina	Ind	Ind	Ind
	Gliadina	39,09	38,35	38,72
	Hordeína	38,32	37,64	37,98
	Secalina	Ind	Ind	Ind

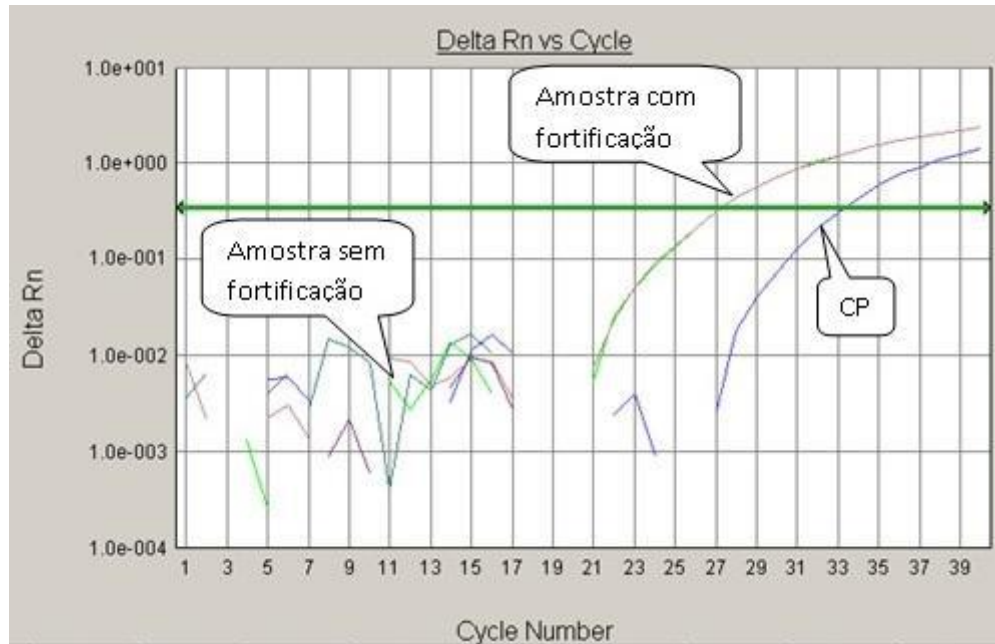
\*Ind (indeterminado): não ocorreu amplificação.

Com exceção de farinha de mandioca em gliadina e hordeína, as demais amostras em seus respectivos alvos não apresentaram amplificação confirmando a ausência de genes específicos ao glúten. As amplificações para farinha de mandioca nos alvos hordeína e gliadina apresentaram altos valores de Ct, o que é característico de contaminação.

#### **4.4 – Avaliação do efeito de matriz de alimentos processados “livres de glúten” para a presença de DNA de glúten**

A fim de otimizar os resultados evitando efeitos de um possível “falso negativo” para as amostras processadas que não apresentaram amplificação em seus respectivos alvos, foram realizadas análises de q-PCR para estas amostras com fortificação e sem fortificação, para verificar prováveis efeitos de matriz. A fortificação foi conduzida com adição do DNA de amostras fontes de glúten na amostra de DNA a ser analisada. A Figura 23 representa um exemplo de resultado de q-PCR para as amostras processadas com e sem fortificação, onde CP representa o controle positivo. Neste caso a amostra utilizada foi a de creme de arroz fortificada com

centeio na presença dos *primers* para o gene alvo secalina. Os demais resultados para as amostras processadas fortificadas estão representados na Tabela 7.



**Figura 23: Curva de amplificação modelo após q-PCR para amostra de creme de arroz sem fortificação e com fortificação (centeio) utilizando os iniciadores S1F, S1R e sonda S1P.**

**Tabela 7: Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação após q-PCR para amostras fortificadas.**

<b>Amostras</b>	<b>DNA alvo</b>	<b>Ct1</b>	<b>Ct2</b>	<b>Ct médio</b>
Arroz integral	Avenina	30,15	30,29	30,22
	Gliadina	27,60	27,59	27,60
	Hordeína	27,55	27,65	27,60
	Secalina	26,74	26,91	26,83
Farinha de mandioca	Avenina	30,09	30,17	30,13
	Secalina	27,14	27,48	27,31
Farinha de trigo	Avenina	30,24	30,44	30,34
Amido de milho	Avenina	30,81	30,73	30,77
	Gliadina	27,74	27,97	27,86
	Secalina	26,31	26,17	26,24
Creme de arroz	Avenina	30,27	30,58	30,43
	Gliadina	27,60	27,53	27,57
	Secalina	27,3	27,31	27,31

Não ocorreu amplificação para as amostras não fortificadas, o que confirma os resultados experimentais obtidos anteriormente para tais amostras processadas.

As condições utilizadas na reação onde foi realizada a “fortificação” (adição de DNA das amostras consideradas fontes de glúten (aveia, centeio, cevada e trigo) ao meio reacional “convencional”) foram as seguintes: 19µL de Mix, 1µL de DNA da amostra processada mais 2µL do DNA da fonte. No caso da fortificação com DNA de aveia o mix foi alterado, devido ao maior LOD para esta fonte. Sendo assim, os volumes usados foram: 16µL de Mix, 1µL de DNA da amostra processada e 5µL de DNA de aveia.

## VI – Conclusão

---

Verificou-se que, mesmo estando estabelecido em legislação, nem sempre as informações contidas nos rótulos apresentam-se corretas, de forma que os indivíduos que são portadores de patologias que necessitem de restrição alimentar, como é o caso dos portadores de DC, ficam inseguros quanto ao consumo de certos alimentos, demonstrando a importância da análise dos seus produtos por parte das indústrias.

Pelo presente estudo, observou-se que foi possível extrair o DNA genômico com êxito de amostras de alimentos pelo método híbrido CTAB/DNeasy para posterior análise. Foi possível também testar os oligonucleotídeos iniciadores descritos pelos pesquisadores chineses, testando-se a eficiência e determinando o limite de detecção de cada um deles nas reações de q-PCR em amostras de alimentos que contém e que não contém glúten. Já para os oligonucleotídeos iniciadores referentes a este trabalho, não foi possível amplificar os fragmentos correspondentes aos genes de Avenina, Gliadina, Hordeína e Secalina, pela análise de PCR em tempo real usando o sistema SYBR Green, mesmo após tentativas de otimização da reação, sendo necessário o desenho de novos *primers*.

Diante do exposto, pode-se considerar a q-PCR como análise de rotina para a detecção de glúten, com a vantagem de ser um método mais rápido e com menos possibilidade de apresentar “falsos” negativos. Assim sendo, a detecção de glúten por q-PCR pode aumentar a confiabilidade de produtos destinados a portadores de doença celíaca.

## VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ACELBRA-RS. Glúten. Disponível em <http://www.ancelbra-rs.org.br/textos/gluten.asp>  
Acesso em 10 de Janeiro de 2012.

BRANQUINHO, M. R. Estudo da quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos pela técnica da reação em cadeia pela polimerase em tempo real: desenvolvimento de método evento específico. 2010. 121f. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.

BRASIL, Lei nº 8543, de 23 de dezembro de 1992. Determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten, a fim de evitar a doença celíaca ou síndrome celíaca. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de dezembro de 1992.

CAO, J.; XU, J.; ZHENG, Q. New real-time fluorescence PCR detecting primer and probe selected from detecting primer or probe of barley Hordein gene, wheat Gliadin gene, rye Sec1 gene, and oat Avenin gene, useful for four sensible gluten ingredients in food. Patent Assignee(s) and Codes(s): CAO, J.(CAOJ-Individual) Derwent Primary Accession Number: 2010-J11889.

CASSOL, C. A. *et al.*, Perfil clínico dos membros da associação dos celíacos do Brasil: regional de Santa Catarina (ACELBRA-SC). **Arq. Gastroenterol.** São Paulo, v. 44, n. 3, Sept. 2007.

CASTELLÓN, L. Falsa raridade. **Isto É, São Paulo**, n. 1650, maio. 2001.

CHARLEY, H. **Foods: a scientific approach**. 3.ed. capítulo 11, p. 179, 1998.

CHARTRAND, L.J. *et al.* Wheat starch intolerance in patients with celiac disease. **J Am Diet Assoc** 97: 612-618, 1997.



CICLITIRA, P.J., ELLIS, H.J., FAGG, N.L.K. Evaluation of a gluten free product containing wheat gliadin in patients with coeliac disease. **BMJ** 289: 83, 1984.

COCCO, R.; SOLÉ, D. Intolerância e Alergia Alimentar. In: Guia de Nutrição Clínica na Infância e na Adolescência - **Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar**. 1ª ed. p. 185-193. Manole 2009.

DAY, L. *et al.* Wheat-gluten uses and industry needs. **Trends in Food Science & Technology**, Volume 17, Issue 2, February 2006, Pages 82-90.

DE BARROS, N.E.F.; OLIVEIRA, E.M.M.; MARIN, V.A. Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 21, n. 1, Feb. 2008.

DAHINDEN, I.; von BÜREN, m.; LÜTHY, J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients, **European Food Research and Technology** (2001) 212: 228–233.

ESCOUTO, L. F. S. **Elaboração de pré-mistura de massa para pão sem glúten a partir de derivados energéticos de mandioca**. 2044. 84f. Tese (Doutorado em Agronomia / Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômica, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

ESTELLER, M.S.; PITOMBO, R.N.M.; LANNES, S.C.S. Effect of freeze-dried gluten addition on texture of hamburger buns. **Journal of Cereal science**, 41: 19-21, 2005.

FELINTO, V.T. **Análise da rotulagem quanto à presença de glúten em chocolates**. Monografia de Especialização em Gastronomia e Saúde. Universidade de Brasília. Ago/2008.

GÉLINAS, P. *et al.*, Gluten contamination of cereal foods in Canada. **International Journal of Food Science and Technology** 2008, 43, 1245–1252.

HARASZI, R., CHASSAIGNE, H., MAQUET, A., ULBERTH, F. Analytical methods for detection of gluten in food - method developments in support of food labeling legislation. **Journal of AOAC International**, Volume 94, Number 4, July-August 2011 , pp. 1006-1025(20).

HONÓRIO, H.M. Polymerase Chain Reaction: O Filme. Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo. 2004. Disponível em: <http://pcrfilme.vilabol.uol.com.br/>. Acessado em 15 de Dezembro de 2011.

HOW SYBR WORKS. 2008 Disponível em: <http://www.youtube.com/watch?v=5ZEySHfCWAU&feature=related>. Acessado em 01 de Março de 2012.

MARQUES, F. Iguaria para raros paladares. **Revista Ciência Hoje**. n 189, dez, 2002.

MEYER, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. **Food Control**. 10(6):391-9, 1999.

NOBRE, S.R.; SILVA, T.; CABRAL, J.E.P. Doença celíaca revisitada. **J Port Gastreenterol.**, vol.14, no.4, p.184-193, set. 2007.

NOVAIS, C.M.; ALVES, M.P. PCR em Tempo Real. Uma Inovação Tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase. **Rev. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 33<sup>a</sup> ed. p. 10-13, Jul/Dez de 2004.

OLEXOVÁ, L. *et al.*, Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. **Food Control** 17 (2006) 234–237.

PIKNOVÁ, L.; BREZNÁ, B.; KUČHTA, T. Detection of gluten-containing cereals in food by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction. **Journal of Food and Nutrition Research**, n. 3, v. 47, p 114-119, 2008.

QU, W. *et al.*, MFEprimer: Multiple Factor Evaluation of the Specificity of PCR Primers. Oxford **Journals Bioinformatics**, Reino Unido, v. 25, n. 2, p. 276-278, 27 nov. 2008.

RAUEN, M.S.; BACK, J.C.V.; MOREIRA, E.A.M.; **Revista de Nutrição de Campinas**, 18(2): 271-276, mar./abr., 2005.

REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION. 2010. Disponível em: <http://www.youtube.com/watch?v=kvQWKcMdyS4&feature=related>. Acessado em 01 de Março de 2011.

SANDBERG, M. *et al.* Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. **European Food Research and Technology** (2003) 217:344–349.

SDEPANIAN, V.L.; DE MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Doença Celíaca: avaliação da obediência à dieta isenta de glúten e do conhecimento da doença pelos pacientes cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil (ACELBRA). **Arquivos de Gastroenterologia**, 2001, vol. 38, n.4. São Paulo, SP.

SDEPANIAN, V.L.; MORAIS, M.B.; NETO, U.F. Doença celíaca: características clínicas e métodos utilizados no diagnóstico de pacientes cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil. **Jornal de Pediatria**. n. 2, v. 77, p. 131-138, 2001.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. 1996

SKERRITT, J.H. & HILL, A.S. Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassay for determination of gluten in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 38, 1771-1778, 1990.

TEDRUS, G. A.S. *et al.*, Estudo da adição de vital glúten à farinha de arroz, farinha de aveia e amido de trigo na qualidade de pães. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, Jan. 2001.

TERRY, C.F.; HARRIS, N.; PARKES, H.C. Detection of GM crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. **Journal of AOAC International** ; 85(3):768-74, 2002.

TERZI, V. *et al.*, Quantitative detection of *Secale cereale* by real-time PCR amplification. **LWT - Food Science and Technology**. 37 (2004) 239–246.

VOGELSANG, H., GRANDITSCH, G., DEUTSCH, H. Oats and wheat starch in the diet of coeliac patients. In Lohiniemi S, Collin P, Mäki M, eds. Changing features of Coeliac Disease. Tampere, Finland: The Finnish Coeliac Society:109-111, 1998.

ZELTNER, D.; GLOMB, M.A.; MAEDE, D. Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. **European Food Research and Technology**. (2009) 228:321–330.

WEIGHARDT, F. Quantitative PCR for the detection of GMOs. In: **The Analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms**. Italy: WHO, 2004. p.10.1-10.19.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v.24 p.115-119, 2007.

WISEMAN, G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International** ; 85(3):792-6, 2002.

## APÊNDICE A

Tabela oligonucleotídeos

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência	Fragmento esperado  (pb)	Referência
Avenina	A2F	5'-cgctcagtggttctaaga-3'	104	Este trabalho
	A2R	5'-ttttattttattgtcaccgctac-3'		
	A3F	5'-aatagacctgcacatgg-3'	166	
	A3R	5'-gtcaaaactgcgagtg-3'		
	A4F	5'-agttcctcgtgcaacag-3'	161	
	A4R	5'-ctggacgacgctatgg-3'		
Gliadina	G2F	5'-cagaaagcgagtggaagatgaaag-3'	181	Este trabalho
	G2R	5'-gcaaggaggacaaagatgaggaa-3'		
	G3F	5'-gcttcagcagattttgg-3'	165	
	G3R	5'-gatgtgtgctggcatgg-3'		
	G4F	5'-cagcaaccatatccatcg-3'	165	
	G4R	5'-ttgggggttggaag-3'		
Hordeína	H2F	5'-attaattcccaaactgaacgacta-3'	164	Este trabalho
	H2R	5'-catggcgaacaatgtgaac-3'		
	H3F	5'-gcaatccgtgcaatcg-3'	168	
	H3R	5'-ctctgcggtacctgttg-3'		

---

	H4F	5'-ggacaactgtaccaaacg-3'	167	
	H4R	5'-acatggcaactgctctg-3'		
	S2F	5'-ttttcagaaagcgagttcaatgatg-3'	181	
	S2R	5'-cgaggacaaagatgaggaaggtct-3'		
Secalina	S3F	5'-tccaccacctgaattcg-3'	168	Este trabalho
	S3R	5'-gttgggagcgtaactag-3'		
	S4F	5'-tcttggtcgagtctcaag-3'	168	
	S4R	5'-gagtcgaagcctattcag-3'		

---

## APÊNDICE B

Tabela oligonucleotídeos - patente

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência	Fragmento esperado  (pb)	Referência
Avenina	A1F	5'cggcgatgtgcgatgtatacg-3'	84	Cao; Xu; Zheng (2010)
	A1R	5'agccctgtagtgttcttagaagc-3'		
Gliadina	G1F	5'-cccaaagtacgacgcaacgac-3'	108	Cao; Xu; Zheng (2010)
	G1R	5'-ggattcggttatgccttcgtg-3'		
Hordeína	H1F	5'-aacagctaaacctatgcaaggta-3'	150	Cao; Xu; Zheng (2010)
	H1R	5'-gttcggggattggggtagttg-3'		
Secalina	S1F	5'-aaaagaacaatcatatccgcagca-3'	230	Cao; Xu; Zheng (2010)
	S1R	5'-gaattggctgtggggctgg-3'		

## APÊNDICE C

Tabela sondas - patente

Gene	Sonda	Sequência	Referência
Avenina	A1P	5'-FAM-cccaccgcagtgccctgtcgc-Eclipse-3'	Cao; Xu; Zheng (2010)
Gliadina	G1P	5'-FAM-catgccgacacacatcaaggtgac-Eclipse-3'	Cao; Xu; Zheng (2010)
Hordeína	H1P	5'- (FAM)-tcctccagcagcagtgagccct-Eclipse-3'	Cao; Xu; Zheng (2010)
Secalina	S1P	5'-FAM-tcacaccaaccatttcccacaccgc-Eclipse-3'	Cao; Xu; Zheng (2010)



## APÊNDICE D

### Protocolo de extração de DNA pelo método híbrido CTAB/DNeasy

- 1 – Pesar 0,1g das amostras de interesse e adicionar 150  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q, 350  $\mu\text{L}$  de tampão CTAB e 5  $\mu\text{L}$  de RNase A/*Qiagen*.
- 2 – Agitar em Vórtex.
- 3 – Incubar à 65°C por 15 minutos, agitando em vórtex a cada 5 minutos.
- 4 – Adicionar 20  $\mu\text{L}$  de proteinase K e incubar à 65°C por 20 minutos. Agitando em vórtex a cada 5 minutos.
- 5 – Proceder de acordo com o protocolo do método DNeasy Plant Mini Kit.
- 6 – Adicionar 200  $\mu\text{L}$  do tampão AP2 à amostra, agitar em vórtex e incubar por 5 minutos no gelo.
- 7 – Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm.
- 8 – Pipetar o lisato/elutato na coluna lilás (acoplada ao tubo coletor) e centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm.
- 9 – Transferir o eluato para um tubo novo e adicionar 1,5 volumes da solução AP3.
- 10 – Homogeneizar pipetando.
- 11 – Pipetar 650  $\mu\text{L}$  da mistura na coluna branca (acoplada ao tubo coletor).
- 12 – Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm e descartar o eluato.
- 13 – Repetir as três etapas anteriores com o que restar de eluato da etapa 9.
- 14 – Acoplar a coluna branca em um novo tubo coletor (presente no kit).
- 15 – Adicionar 500  $\mu\text{L}$  do tampão AW e centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm.
- 16 – Descartar o eluato e reutilizar o tubo na próxima etapa.
- 17 – Adicionar mais 500  $\mu\text{L}$  do tampão AW a coluna e centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm.
- 18 – Descartar novamente o eluato.
- 19 – Transferir a coluna branca para um tubo novo (1,5 ou 2,0  $\mu\text{L}$ ).
- 20 – Pipetar 50  $\mu\text{L}$  do tampão AE (tampão de eluição) na mesma.

21 – Incubar por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm.

22 – Repetir as etapas 20 a 21.