

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM ENCANTADO
BACHARELADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

WEMERSON DE CASTRO OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE GLÚTEN POR qPCR: UMA ALTERNATIVA PARA
RASTREAMENTO EM ALIMENTOS PROCESSADOS**

ENCANTADO

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM ENCANTADO
BACHARELADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

WEMERSON DE CASTRO OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE GLÚTEN POR qPCR: UMA ALTERNATIVA PARA
RASTREAMENTO EM ALIMENTOS PROCESSADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eléia Righi

ENCANTADO

2022

Catálogo de publicação na fonte (CIP)

O48d Oliveira, Wemerson de Castro

Detecção de glúten por qPCR: uma alternativa para rastreamento em alimentos processados/ Wemerson de Castro Oliveira. – Encantado: Uergs, 2022.

36 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Bacharelado), Unidade em Encantado, 2022.

Orientadora: Prof.^a Dra. Eléia Righi

1. Alergênico. 2. Biologia molecular. 3. *in silico*. 4. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). I. Righi, Eléia. II. Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Bacharelado), Unidade em Encantado, 2022. III. Título.

Catálogo elaborada pelo Bibliotecário Uergs - Marcelo Bresolin CRB10/2136

WEMERSON DE CASTRO OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE GLÚTEN POR qPCR: UMA ALTERNATIVA PARA
RASTREAMENTO EM ALIMENTOS PROCESSADOS**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eléia Righi

Aprovado em: 09/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eléia Righi

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro

Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

Prof.^a. Msc. Magnólia Martins Erhardt

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Dedico este trabalho a minha pessoa...
Por quem me tornei e por quem ainda vou me
tornar... pois o conhecimento molda e
modifica constantemente, como uma obra de
arte toma forma a cada gesto do artista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ser tão maravilhoso e presente em minha vida, por ser a minha estrutura, meu guia, meu tudo e encher a minha vida de amor e paz.

Aos meus pais, Eva e Adelson que na sua simplicidade e humildade souberam com palavras e gestos corretos me encorajar, aconselhar, guiar e direcionar, sendo o amor gerado por eles, um combustível que me permitiu fazer o impossível.

À minha grande e generosa irmã Nayara Caroline e minha Tia Luiza que mesmo distante fizeram presente em cada momento de alegria e tristeza da minha vida.

A todos que foram o meu sustento durante toda a minha caminhada acadêmica, científica e profissional.

À Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS Agrícola por ter me oportunizado realizar este trabalho.

À professora Dra. Eléia Righi que com muita sabedoria soube me orientar sempre com muita atenção, confiança, paciência e dedicação ao longo dessa caminhada.

Ao meu amigo e irmão prof. Dr. Humberto Húngaro por ter aceitado com muito carinho a participar da banca examinadora e por estar ao meu lado em mais um momento importante da minha vida.

À minha amiga e “mãezona” profa. MSc. Magnólia Martins Erhardt que tanto contribuiu para que eu pudesse chegar a esse momento, além de ter aceitado a participar da banca examinadora e contribuir grandemente para a melhoria do trabalho.

Aos meus querid@s Hans, Lizandro, Luis Carlos, Cris, Aline, Vanessa (Igreja), Mari, Maíra, Nati, Elisa, Fê que fizeram a minha vida mais feliz e amorosa.

Aos funcionários e professores da UERGS de Encantado pelos ensinamentos e conselhos durante a minha formação.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“A História tem demonstrado que os mais notáveis vencedores normalmente encontraram obstáculos dolorosos antes de triunfarem. Eles venceram porque se recusaram a se tornarem desencorajados por suas derrotas.”

B. C. Forbes

RESUMO

Este trabalho relata um ensaio de PCR em tempo real para detectar especificamente a presença de glúten em matrizes alimentares complexas, bem como realizar uma prospecção, *in silico*, de primers utilizados em pesquisas científicas. Os testes *in silico* foram realizados utilizando dois softwares, MFE e NETprimer, e os parâmetros de conteúdos GC, T_m (°C), ΔG (kcal/mol), formação de dímero e grampos, bem como a sua classificação também foram avaliados. O primer “Wheat-w-Gliadin” apresentou os melhores parâmetros médios: tamanho= 24 pb; GC= 44%; T_m= 62,5 °C; ΔG= -32,25 kcal/mol; sem formação de dímeros ou grampos; e uma classificação máxima do primer (100). Houve diferenças de resultados entre os softwares utilizados. Os primers utilizados foram “WF1-WR1”, “tritprglut” e “Planta 18S” (gene referência), que tiveram valores médios de ciclo de quantificação (C_q) de 17.43, 34.30 e 16.98, respectivamente. O protocolo da PCR em tempo real foi validado em diferentes carnes (bovino, frango, suíno, cavalo e ovino) com um C_q médio de 25,69. A aplicabilidade do ensaio ainda foi aplicada por meio de análises com produtos alimentícios obtidos em ambientes comerciais, sendo: barra de cereal, chocolate, biscoito água e sal, e dois tipos de *snacks*. Todos os alimentos estavam em conformidade com as informações contidas no rótulo, exceto a barra de cereal que estava identificada como “pode conter glúten” e apresentou uma concentração de “alto teor” (1.925 mg/kg). O valor de LD foi de 36 ciclos e LQ de 60 mg/kg, estando dentro da faixa de classificação de “baixo teor”. Para finalizar, foram testados dois tipos de fluorogênico SYBR[®] Green e Eva Green, sendo o primeiro mais eficiente para a análise de detecção do glúten. Eva Green apresentou uma fluorescência muito elevada não sendo possível determinar os valores de C_q do DNA na curva padrão e nas amostras. Os resultados destacam a potencialidade da técnica de PCR em tempo real na detecção de glúten e/ou alergênicos em alimentos com matriz complexa, como chocolate e barra de cereal testadas neste estudo, se mostrando sensível e robusta para detectar a presença de concentrações de glúten potencialmente nocivas para consumidores celíacos.

Palavras-chave: rastreamento glúten, alergênico, biologia molecular, proteína vegetal, *in silico*

ABSTRACT

This work reports a real-time PCR assay to specifically detect the presence of gluten in complex food matrices, as well as to carry out an *in silico* prospection of primers used in scientific research. The *in silico* tests were carried out using two softwares, MFE and NETprimer, and evaluated the parameters GC content, T_m ($^{\circ}\text{C}$), ΔG (kcal/mol), dimer and hairpin formation, as well as the classification. The “Wheat-w-Gliadin” primer showed the best average parameters: size= 24 bp; GC= 44%; T_m = 62.5 $^{\circ}\text{C}$; ΔG = -32.25 kcal/mol; no dimer or hairpin formation; and a maximum rating (100). There were differences in results between the software used. The primers used were “WF1-WR1”, “tritprglut” and “Planta 18S” (reference gene), which had mean C_q values of 17.43, 34.30 and 16.98, respectively. The real-time PCR protocol was validated in different meats (beef, chicken, pork, horse and lamb) with an average quantification cycle (C_q) of 25.69. The applicability of the test was also applied through analyzes with food products obtained in commercial environments, namely: cereal bars, chocolate, crackers and two types of snacks. All foods complied with the information on the label, except for the cereal bar which was identified as “may contain gluten” and had a “high content” concentration (1,925 mg/kg). The LD value was 36 cycles and the LQ 60 mg/kg, being within the “Low content” classification range. Finally, two types of fluorogenic SYBR® Green and Eva Green were tested, the first being more efficient for gluten detection analysis. Eva Green showed very high fluorescence and it was not possible to determine the C_q values of the DNA in the standard curve and in the samples. The results highlight the potential of the real-time PCR technique in detecting gluten and/or allergens in foods with a complex matrix, such as chocolate and cereal bars tested in this study, proving to be sensitive and robust to detect the presence of potentially high gluten concentrations. harmful for celiac consumers.

Keywords: gluten tracking, allergen, molecular biology, vegetable protein, *in silico*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de primers, genes de referência, sequência direta e reversa e do controle positivo que serão usados no experimento para a detecção de glúten.....	17
Tabela 2. Descrição dos produtos processados e industrializados obtidos comercialmente.....	19
Tabela 3. Análise in silico de primers utilizados em estudos com glúten.....	20
Tabela 4. Resultados dos valores Cq da avaliação qualitativa dos primers “tritprglut” e “W.F1/W.R1” e do gene de referência planta 18S	25
Tabela 5. Detecção qualitativa do alvo glutenina empregando diferentes carnes contaminadas artificialmente com 5% de glúten	27
Tabela 6. Detecção quantitativa (qPCR) do gene alvo glutenina de alimentos processados e industrializados através do mastermix contendo SYBR Green.....	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática dos dímeros formado pelos primer *forward* Tri25-F e *reverse* PR.GluteninR24
- Figura 2. Perfil de amplificação dos genes específico da glutenina, 18 S e 25S rRNA (W.F1/W.R) e do gene de referência em amostra de carne bovina artificialmente contaminados com 10% de glúten através do mastermix contendo SYBR Green.....26
- Figura 3. Detecção qualitativa do DNA extraído de cinco carnes de diferentes espécies animais, artificialmente contaminados com 5% de glúten, através do mastermix contendo SYBR Green.....27
- Figura 4. Eficiência da curva padrão de glúten obtida a partir da amplificação do gene da glutenina através do mastermix contendo SYBR Green (100 ng/uL - 0,00015 ng/uL).....28
- Figura 5. Curva de amplificação do gene alvo glutenina de alimentos processados e industrializados através do mastermix contendo SYBR Green. SF= snacks food; SQ= snacks queijo; BC= barra de cereal; CH= chocolate; BAS= biscoito água e sal; FA= farinha de trigo (controle positivo).....29
- Figura 6. Eficiência da curva padrão de glúten obtida a partir da amplificação do gene da glutenina através do mastermix contendo Eva Green (100 ng/uL - 0,00015 ng/uL)31
- Figura 7. Gráficos multicomponente obtido empregando o mastermix contendo o corante Eva Green.32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MÉTODOS DE ANÁLISE DE ALIMENTOS	16
2.1 TESTES <i>in silico</i>	16
2.2 AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS PRIMERS	17
2.2.1 Preparo da amostra com glúten	17
2.2.2 Detecção de glúten	17
2.2.3 Extração do DNA	17
2.2.4 PCR em tempo real quantitativo (qPCR)	18
2.3 AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS PROCESSADOS E INDUSTRIALIZADOS	18
2.4 ESTATÍSTICA	19
3 ANÁLISE E DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS	19
3.1 Prospecção e análise <i>in silico</i> de primers para detecção de glúten	19
3.2 Avaliação qualitativa e validação de primers para detecção de glúten em carne fraudada artificialmente	25
3.3 Análises de alimentos processados por Qpcr	28
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
5 REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A alergia alimentar é uma resposta imunomediada que ocorre de forma reprodutível após a exposição a um determinado alimento, componente ou ingrediente. Pode ser mediada por imunoglobulinas E (IgE) específicas que interagem com mastócitos/basófilos presentes no intestino ou por células T e isótipos de anticorpos como IgG, IgM e IgA (SENA-TORRALBA *et al.*, 2020). Atualmente, há mais de 200 alimentos comprovadamente alergênicos (SENA-TORRALBA *et al.*, 2020), sendo os mais comuns os cereais que contêm glúten (trigo, centeio, cevada, aveia, espelta), crustáceos, ovo, peixe, amendoim, soja, leite e noz (FAO; WHO, 2022), que podem desencadear sintomas gastrointestinais, problemas respiratórios ou sistêmicos, havendo risco de vida (PAULA PENNA *et al.*, 2021). Embora os últimos desenvolvimentos em imunoterapia com alérgenos alimentares tenham mostrando resultados promissores, evitar o alimento agressor continua sendo a única opção para prevenir reações alérgicas (FAO; WHO, 2022).

Os cereais ganharam um interesse renovado como culturas de nicho de mercado em resposta à demanda por alimentos saudáveis (PEGELS *et al.*, 2015). Apesar de suas propriedades funcionais, proteínas presentes nos grãos, como gliadina (trigo), hordeína (cevada) e secalina (centeio), têm sido associadas a diferentes patologias humanas como doença celíaca, alergia ao trigo e sensibilidade ao glúten não celíaca (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2019). À vista disso, a alergia ao trigo é conhecida como uma reação imunológica adversa à glúten e outras proteínas encontradas no trigo, causando reações como inchaço nos lábios e boca, urticária, angioedema, obstrução brônquica, náusea ou dor abdominal (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2019). Neste tipo de processo alérgico não são observados danos intestinais graves ou deficiências nutricionais (MUJICO *et al.*, 2011). Já a doença celíaca é uma das hipersensibilidades mais frequentes em todo o mundo, é definida como uma intolerância permanente as proteínas de trigo, cevada e centeio sendo causada por uma combinação de fatores genéticos (antígenos HLA-DQ2 e HLA-DQ8) e ambientais (consumo de glúten), além de um terceiro fator ainda desconhecido que inicia a perda de imunotolerância ao glúten (XHAFERAJ *et al.*, 2020).

Apesar de ensaios clínicos terem concluído que os celíacos podem tolerar níveis inferiores a 50 mg/dia de glúten, o Codex Alimentarius define alimentos “sem glúten” (“*gluten-free*”) os que têm 20 mg/kg ou menos dessa proteína (ISDI, 2018) e “muito baixo glúten” os de 20 a 100 mg/kg, informações essas que devem ser rotuladas (FAO; WHO, 2022). Assim, governos e agências reguladoras têm reconhecido a necessidade de concentrar os regulamentos de rotulagem de alérgenos em um conjunto limitado de “alérgenos prioritários” (SENA-

TORRALBA *et al.*, 2020). No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26, de 02 de julho de 2015, dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares. Além dela, a Instrução Normativa (IN) nº 75 estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados (BRASIL, 2020), exigem a obrigatoriedade da rotulagem de ingredientes que causam alergias ou intolerâncias, incluindo os cereais que contenham glúten (BRASIL, 2015). A mais recente, a RDC nº 429 de 08 de outubro de 2020 também estabelece alguns critérios para a rotulagem de alimentos com alergênicos (BRASIL, 2020).

Conforme estabelecido pelo Codex Alimentarius, os produtos com rótulo sem glúten não devem conter níveis dessa proteína acima de 20 mg/kg para o consumo seguro por pacientes com doença celíaca. Isso faz com que métodos analíticos para detectar o alergênico precisem ser suficientemente sensíveis, específicos, adequados para análises de rotina e validados por estudos colaborativos. Em vista disso, a análise de autenticidade de produtos à base de cereais é necessária para cumprir as regras de rotulagem, evitar concorrência econômica desleal e proteger os consumidores (PEGELS *et al.*, 2015; VISCIANO; SCHIRONE, 2021).

Para detectar e/ou quantificar a prolamina, a fração de glúten, normalmente se utiliza ensaio imunoenzimático (ELISA). No entanto, devido à grande complexidade da proteína e outros ingredientes presentes nos alimentos, às vezes essas tecnologias podem fornecer resultados falsos positivos e negativos. Sena-Torralba e colaboradores (2020) destacam que o desenvolvimento de métodos baseados em ácidos nucleicos para fins de detecção de alérgenos são menos propensos a resultados falso-negativos do que os imunoenaios, pois podem superar a desnaturação de proteínas relacionadas ao processamento dos alimentos.

Buscando resolver as limitações do método de ELISA, outras técnicas não imunológicas também têm sido pesquisadas e empregadas na identificação da prolamina, como a espectrometria de massa (MALDI-TOF) e moleculares, baseados em PCR, que se tornam cada vez mais aplicáveis (VALDES *et al.*, 2003; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2019; XHAFERAJ *et al.*, 2020). No entanto, a sensibilidade do sistema MALDI-TOF é apenas para concentrações superiores de 20-25 mg/kg e um método com sensibilidade de até 10 mg/kg se faz necessário para a detecção do glúten nos alimentos. Além disso, avanços têm sido observados com os métodos ddPCR (*droplet digital polymerase chain reaction*) e LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), sendo o primeiro tendo a vantagem de ser altamente sensível e o último por evitar o uso de termocicladores, tornando-o promissor devido ao seu baixo custo (SENA-TORRALBA *et al.*, 2020).

Xhaferaj e pesquisadores (2020) destacam que os testes por ELISA e PCR são amplamente utilizados no controle de qualidade, porém outros como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS), imunossensores, *microarrays*, estão ganhando cada vez mais importância por fornecerem informações detalhadas sobre o glúten. Salientam ainda que métodos moleculares apresentam limitações na detecção de gliadina, até a concentração de 50 mg/kg de trigo, centeio e cevada, em alimentos altamente hidrolisados e processados devido a degradação do DNA.

Em contrapartida, Costa e colaboradores (2017) conseguiram detectar/quantificar, através do método qPCR, soja como ingrediente alergênico em produtos cárneos processados na concentração de 9,8 pg de DNA. A precisão, repetibilidade e robustez dos testes com essa ferramenta molecular foi adequada nas análises de 25 amostras de carne suína e presuntos cozidos de aves e mortadelas, crus e processados termicamente, com presença de soja em 11 produtos, na faixa de 0,1 - 4% (p/p). Outro estudo que também apresentou alta sensibilidade na detecção de gliadina (*genes pML1*), secalina e avenina para trigo, milho, centeio e aveia, respectivamente, foi o realizado por Yilmaz e colaboradores (2019). Martín-Fernández e colaboradores (2015), usando PCR em tempo real, reportaram resultados com alta sensibilidade utilizando o marcador $\alpha 2$ -gliadina obtendo limite absoluto de detecção (LAD) de 2 pg de DNA de trigo e um LAD relativo de 0,005% (50 mg/kg) de trigo em soja, que corresponde a 4,5 mg/kg de glúten.

Assim, identificar a presença de tais espécies de cereais em um produto é de primordial importância, não só para prevenir riscos de segurança alimentar em pessoas sensíveis ou indivíduos alérgicos, mas também para evitar fraudes econômicas (AMIGO; POPPING, 2012). Dois estudos realizados no Canadá identificaram a presença de glúten em produtos alimentícios que não deveriam ter a presença desse alergênico. No primeiro estudo, realizado em 2011, foi relatado altos níveis de glúten em 82% (n=131) das amostras de aveia testadas (KOERNER *et al.*, 2011). O estudo subsequente, realizado dois anos depois, detectou a presença de glúten em 32% (n=640) das farinhas sem glúten vendidas em lojas de varejo (KOERNER *et al.*, 2013).

Kryuchenko e colaboradores (2021) identificaram salsichas e farinhas (milho, lentilha, trigo) sem glúten fraudulentos utilizando PCR e ELISA. Detectaram fraude em quatro (duas de salsicha e duas de farinha) das nove amostras testadas com concentração de glúten superior a 20 mg/kg por ambos os métodos. No Brasil, um estudo realizado em 2019 identificou contaminação por glúten, através de ensaios imunoenzimáticos, em 2,8% (n=180) dos alimentos tradicionais brasileiros comercializados em 60 serviços de alimentação, sendo desses, 6,7% positivaram para presença de glúten nas refeições (FORAGE *et al.*, 2019). Esses estudos

destacam o risco de contaminação cruzada e mostram a importância de se ter o controle da presença de alérgenos nos alimentos *free gluten*, uma vez que, podem causar danos à saúde e problemas para pessoas com doença celíaca.

Na busca por uma metodologia para detecção rápida e eficiente, o sistema de PCR em tempo real pode ser usado como ferramenta não imunológica para confirmar a presença de alérgenos, em especial o glúten, em alimentos, visando a segurança de pacientes intolerantes. Com isso, objetivou-se padronizar e validar a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para o rastreamento de glúten em alimentos processados, bem como prospectar e analisar, *in silico*, primers com maior eficiência de detecção e acurácia dos resultados.

2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

2.1 TESTES *in silico*

A análise *in silico* foi utilizada com o objetivo de prospectar e avaliar primers com maior potencial para utilização em qPCR. Para isso foram utilizados dois algoritmos para a triagem denominados de MFEprimer-3.1 (WANG *et al.*, 2019) (<https://mfepimer3.igenetech.com/spec>) e NETprimer (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimerServlet>). Inicialmente, foi realizada uma busca, nas bases de dados eletrônicas científicas, por artigos em inglês, espanhol ou português independente do ano de publicação. Os trabalhos não originais, como editoriais, cartas, comentários e capítulos de livros, foram excluídos. Os termos de pesquisa utilizados foram “PCR”, “qPCR” e “gluten” e combinados entre eles para maior abrangência e relevância dos resultados.

Os artigos identificados através da estratégia de busca foram avaliados de forma independente. A fase inicial de seleção dos artigos consistiu na análise dos títulos, seguida dos resumos e por fim das metodologias para o levantamento dos primers utilizado nos estudos. Artigos que não descreveram os primers utilizados e somente citaram o trabalho onde extraram-se os oligonucleotídeos foram desconsiderados da análise. Foram selecionados 11 estudos publicados entre os anos de 2003 e 2019 e analisados 23 conjuntos de primers. As especificidades básicas levantadas foram: conteúdo GC (GC%), temperatura de Melting (T_m °C), energia livre do iniciador (ΔG Kcal/mol), grampos, dímeros e classificação individual (rating) baseado no cálculo: $\text{Rating} = 100 + (\Delta G (\text{Dimer}) * 1.8 + \Delta G (\text{Hairpin}) * 1.4)$ (NETPRIMER, 2022). Para a apresentação dos resultados de classificação individual realizou-se a média entre os primers *forward* e *reverse*.

2.2 AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS PRIMERS

2.2.1 Preparo da amostra com glúten

Para a elaboração da matriz-modelo de glúten, foi adicionado em diferentes tipos de carne farinha de trigo, contendo glúten, na concentração de 50-100 mg/kg (5-10%). Foram adquiridas carnes de referência certificadas (MRC) da LGC (Reino Unido) para cada espécie animal, sendo 100% (p/p) de carne de cavalo (LGC7220), bovina (LGC7221), suína (LGC7222), ovelha (LGC7223) e frango (LGC7224). Como controle positivo foi utilizado farinha de trigo comercial.

2.2.2 Detecção de glúten

Os conjuntos de primers utilizados nesse estudo foram descritos por Mujico e colaboradores (2011) e Zeltner e colaboradores (2009) e o controle positivo de amplificação da planta conforme sequências publicadas por Allmann e colaboradores (1993) (Tabela 1). Os primers W F1 e W R1 amplificam um fragmento de 51 pares de bases (pb) da região intergênica limitada pelos genes que codificam o 25S e 18S RNA ribossômico, detectando níveis de prolamina abaixo de 1,5 mg/kg trigo (MUJICO *et al.*, 2011). Já o sistema HMW glutenina, permite detectar 2,5 mg/kg de trigo em matrizes alimentares vegetais e 5 mg/kg de trigo em produtos cárneos (ZELTNER *et al.*, 2019). Os primers (Invitrogen - ThermoFisher Scientific) foram inicialmente testados, em relação a sua eficiência de amplificação, com DNA extraído de carne bovina contaminada com farinha de trigo.

Tabela 1. Identificação de primers, genes de referência, sequência direta e reversa e do controle positivo que foram usados no experimento para a detecção de glúten.

Nome	Gene de referência	Sequência	Referência
W.F1	25S e 18S rRNA	5'-CGTCGTGGACGGAAGTTGA-3'	Mujico <i>et al.</i> (2011)
W.R1		5'-ACGTGGTTTTGCCAGTTTT-3'	
tritprglut 3 F	HMW Glutenina B1-1	5'-CCTCTTTGCGGCAGTAGTYGT-3'	Zeltner <i>et al.</i> (2009)
tritprglut 3 R		5'-CTCGCRCTCACABTGTAGTTG-3'	
Controle de amplificação da planta	18S rRNA	5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'	Allmann <i>et al.</i> (1993)
		5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'	

2.2.3 Extração do DNA

O DNA total foi extraído de 0,2 g da carne (contaminada intencionalmente) usando o kit DNeasy® mericon® Food (QIAGEN, 2020), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e a pureza do produto extraído foram avaliadas por espectrofotômetro UV (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific) e mantido sob refrigeração (≤ 8 °C). O DNA extraído foi

padronizado para a concentração final de 10 ng. Todas as amostras foram extraídas em duplicata, incluindo uma amostra de controle positivo (farinha de trigo pura).

2.2.4 PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

A análise de qPCR em tempo real foi realizada utilizando o kit QuantiNova™ SYBR® Green PCR e/ou SsoFast EvaGreen Supermixes (Bio-Rad). As misturas da reação seguiram as quantidades propostas pelos rótulos do fabricante, com modificação no volume final para 10 µL e DNA numa concentração 10 ng/PCR. Para a reação foram utilizados 8 µL da mistura de reação e 2 µL do DNA extraído. Os detalhes da mistura de reação foram seguidos conforme descrito pelo fabricante (QIAGEN, 2014).

Por se tratar de um protocolo de início rápido, o kit QuantiNova™ SYBR® Green PCR, estabelece uma etapa inicial de ativação a 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 5 segundos e combinação das etapas de anelamento/extensão a 60 °C por 10 segundos. Os experimentos foram realizados com o QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) e as condições qPCR seguiu o recomendado pelo fabricante do kit. A curva padrão foi construída utilizando DNA extraído da farinha de trigo nas concentrações entre 6.1 e 100 000 mg/kg que variam desde traço até alto teor de glúten. Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

Os resultados obtidos pelo QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System foram avaliados pelo programa *Design and Analysis Software 2.6.0* (ambos Thermo Fisher Scientific). Realizou-se a avaliação do valor C_q das análises realizadas, tanto para as amostras de carne fraudadas com glúten intencionalmente, quanto para os alimentos processados e industrializados.

2.3 AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS PROCESSADOS E INDUSTRIALIZADOS

Um total de cinco produtos alimentícios comerciais foram adquiridos no comércio local da cidade de Lajeado (RS) com características diferenciadas quanto os cereais alvo, sendo: barra de cereal (n=1); biscoito de água e sal (n=1 – controle positivo); chocolate (n=1); e snacks (n=2). A tabela 2 inclui uma breve descrição dos alimentos.

Tabela 2. Descrição dos produtos processados e industrializados obtidos comercialmente.

Alimento	Código	Classificação*	Ingredientes
Barra de cereal	BC	Pode conter glúten	Glucose de milho, abacaxi desidratado, aveia laminada, amêndoas, uva passa, coco desidratado, castanhas de caju, castanha do pará, flocos de arroz, antioxidante e lecitina de soja.
Biscoito água e sal**	BAS	Contém derivados de trigo e soja	Farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico, óleo vegetal, açúcar invertido, sal, açúcar, cloreto de potássio, amido, fermentos químicos bicarbonato de amônio e sódio e emulsificante lecitina de soja e ésteres de mono e diglicerídeos de ácidos graxos com ácido diacetil tartárico.
Chocolate	CH	Sem glúten	Chocolate 41% cacau: Edulcorante natural maltitol, manteiga de cacau, polidextrose, massa de cacau, extrato de soja, emulsificantes lecitina de soja e INS 476, aromatizantes, sal e edulcorante artificial sucralose).
Snacks food	SF	Não contém glúten	Farinha de grão-de-bico, farinha de arroz, amido de batata, farinha de milho, óleo de girassol, sal e aromatizante natural.
Snacks queijo	SQ	Sem glúten	Canjica de milho não transgênico, óleos vegetais (milho, soja e algodão), sal hipossódico, extrato de levedura, corante natural de urucum e aromas.

** Alimento usado como controle positivo.

2.4 ESTATÍSTICA

O programa GraphPad Prism (versão 8,2) foi utilizado para realizar as análises estatísticas de variância e as médias comparadas pelo teste Anova e Tukey, com nível de significância de 95%.

3 ANÁLISE E DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

3.1 Prospecção e análise *in silico* de primers para detecção de glúten

No total 11 publicações foram selecionadas durante a prospecção de primers para detecção de glúten e/ou alergênicos e 23 conjuntos de oligonucleotídeos foram selecionados para análise *in silico* (Tabela 3). Mesmo que as sequências dos primers sejam obtidas de publicações internacionais, faz-se necessária uma avaliação prévia para garantir maior eficiência e precisão nos ensaios baseados em DNA (IWOBI *et al.*, 2011), uma vez que, o fragmento de DNA iniciador é instável e pode formar estruturas intramoleculares (*hairpins*) e intermoleculares (*self dimer* e *cross dimer*) (FRÖDER, 2022).

Os iniciadores possuíam um tamanho médio (*forward/reverse*) de 22 pares de bases (pb), sendo três conjuntos de primers com tamanho médio entre 18-19 pb (a2g; type 2; ITS2) que diferiram do WBR com a maior média de 26 pb. O comprimento dos oligômeros de DNA, que deve estar entre 18 e 30 nucleotídeos para que tenha boa eficiência de anelamento ao DNA alvo, pode influenciar na formação de grampos que afetam a reação de PCR (FRÖDER, 2022).

Analisando os primers individualmente, todos estiveram dentro do comprimento indicado por Fröder (2022), variando entre eles de 18 a 30 pb.

Além disso, os primers individuais foram classificados de acordo com os dados fornecidos pelo algoritmo NETprimer (Tabela 3) que seleciona primers para gerar um único produto de PCR (ROZEN; SKALETSKY, 2000). A eficiência prevista de uma sequência iniciadora pode ser classificada de maneira rápida e possibilita a triagem de oligômeros de DNA mais próximos para a aplicação na prática. Quanto maior a classificação de um primer, maior sua eficiência de amplificação (NETPRIMER, 2022). Dos 23 conjuntos de oligonucleotídeos analisados, o “Wheat-w-Gliadin” (SANDBERG *et al.*, 2003) apresentou a classificação máxima de 100, seguido por dois outros com os valores médios de 96, sendo eles “ α 2-gliadin” (MARTÍN-FERNÁNDEZ *et al.*, 2015) e “Wheat, barley e rye” (PIKNOVÁ *et al.*, 2008) e a menor classificação (77) para o primer “Agglutinin isolectin” (MARTÍN-FERNÁNDEZ *et al.*, 2016).

A ISO/TS 20838 (2006) orienta que o desenho do primer deve levar em consideração a razão GC:AT de 50:50, ou o mais próximo dessa proporção, e a ausência de concentração das bases Gs e Cs em segmentos curtos de primers devido à alta estabilidade interna. O conteúdo GC médio foi de 49% variando entre 36 (Barley system 1 – HV) e 59% (Agglutinin isolectin - Tri18 e Barley system 2 – hor) considerando o conjunto de primers (*forward/reverse*). Na análise individual do conteúdo GC, 13 deles estiveram fora da faixa ideal que seria entre 40 e 60%. Além disso, a Tm ideal deve estar entre 60 e 65 °C (BUSTIN *et al.*, 2017), de modo que o valor negativo alto de energia livre de Gibbs (ΔG), necessária para quebrar a estrutura secundária, indica grampos estáveis e indesejáveis. Os valores de Tm foram próximos entre os dois *softwares*, em todos os conjuntos de primers, apresentando um valor médio de 60,7 e 61,0 °C para o MFE e NETprimer, respectivamente e não diferindo estatisticamente. O inverso foi observado para os valores de ΔG que foram discrepantes entre os algoritmos, sendo -23,4 e -37,3 kcal/mol, respectivamente ($p < 0,05$).

Tabela 3. Análise *in silico* de primers utilizados em estudos com glúten.

Referência	Sequência de nucleotídeo*	Identificação*	Tamanho (pb)	Classificação**	Especificidade									
					GC (%)		Tm (°C)		ΔG (kcal/mol)		Grampos		Dímeros	
					MFE	NETpr	MFE	NETpr	MFE	NETpr	MFE	NETpr	MFE	NETpr
Martín-Fernández et al., 2015	α2-gliadin	Gly-F	21	100	57,1	57,1	65,4	70,5	-25,3	-42,9	nf	nf	nf	nf
		Gly-R	25	92	48,0	48,0	65,0	68,8	-27,7	-43,65	nf	nf	nf	nf
	Agglutinin isolectin	Tri18-F	23	78	52,2	52,1	62,7	62,2	-24,7	-38,6	nf	nf	nf	nf
		Tri18-R	24	89	45,8	45,8	63,3	60,9	-24,1	-38,3	nf	nf	nf	nf
	Thioredoxin h	Tri25-F	24	84	45,8	45,8	63,3	64,6	-25,6	-39,2	nf	nf	sim (F X F)	nf
		Tri25-R	21	81	57,1	57,1	63,0	63,4	-35,6	-38,2	nf	nf	nf	nf
Martín-Fernandez et al., 2016	Agglutinin isolectin	Tri18-FS	23	93	65,0	65,0	64,8	65,6	-24,0	-39,5	nf	nf	nf	nf
		Tri18-RS	24	61	52,7	52,1	63,1	65,7	-25,3	-38,9	nf	nf	nf	nf
García-García et al., 2019	ITS2	WBR-ITSfw	18	88	61,1	61,1	61,6	60,6	-21,3	-34,1	nf	nf	nf	nf
		WBR-ITSrev	20	-	50,0	-	59,4	-	-21,9	-	nf	-	nf	-
Garrido-Maestu et al., 2018	-	a2g-F3	19	91	52,6	52,6	59,2	58,6	-20,9	-33,4	nf	nf	nf	nf
		a2g-B3	18	86	55,5	55,5	57,1	54,6	-19,8	-30,5	nf	nf	nf	nf
		a2g-F	22	81	63,6	63,6	65,6	65,7	-25,8	-39,2	nf	nf	nf	nf
		a2g-R	23	83	52,1	52,1	66,4	70,1	-26,7	-42,56	nf	nf	nf	nf
Henterich et al., 2003	-	Type 1F	22	77	45,4	45,4	59,9	59,7	-22,8	-35,8	nf	nf	nf	nf
		Type 1R	24	81	37,5	37,5	59,4	61,2	-23,5	-38,5	nf	nf	nf	nf
		Type 2F	19	100	63,1	63,1	63,0	60,5	-22,8	-34,3	nf	nf	nf	nf
		Type 2R	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mujico et al., 2008	-	WBRF8	30	85	20,0	20,0	56,2	62,2	-24,2	-46,0	nf	nf	nf	nf
		WBRR8	23	89	43,4	43,4	59,7	60,8	-23,2	-37,9	nf	nf	nf	nf
Mujico et al., 2011	-	W.F1	19	86	57,8	57,8	60,5	59,7	-21,9	-33,5	nf	nf	nf	nf
		W.R1	20	87	45,0	45,0	59,6	59,6	-21,5	-35,9	nf	nf	nf	nf
Piknová et al., 2008	Wheat, barley e rye	pinbF	20	100	55,0	55,0	61,3	59,5	-22,3	-34,6	nf	nf	nf	nf
		pinBR2	20	92	45,0	45,0	56,9	56,4	-20,5	-32,5	nf	nf	nf	nf
	Eukaryotic	TR03	25	87	44,0	44,0	62,1	64,3	-25,4	-41,8	nf	nf	nf	nf
		TR04	25	70	56,0	56,0	70,9	76,1	-30,9	-52,65	nf	nf	nf	nf
	Biotin	F	21	92	57,1	57,1	61,4	58,9	-23,2	-35,2	nf	nf	nf	nf

Pinto et al., 2013		R	19	86	47,3	47,3	53,1	49,3	-18,3	-29,4	nf	nf	nf	nf
Sandberg et al., 2003	Wheat - w-Gliadin	TAG2315F	25	100	44,0	44,0	61,1	63,9	-25,3	-41,5	nf	nf	nf	nf
		TAG2473R	23	100	47,8	47,8	61,1	62,4	-23,8	-38,5	nf	nf	nf	nf
	Rye - w-Secalin	SEC2599F	26	90	34,6	34,6	59,8	64,2	-24,9	-42,5	nf	nf	nf	nf
		SEC2756R	24	92	50,0	50,0	62,4	63,0	-25,1	-39,6	nf	nf	nf	nf
	Barley - Hordein	HVH1618F	24	85	33,3	33,3	56,8	57,5	-21,9	-37,6	nf	nf	nf	nf
		HVH1763R	19	90	47,3	47,3	55,8	54,7	-19,7	-31,0	nf	nf	nf	nf
	Oats - Avenin	ASA1097F	19	91	52,6	52,6	57,3	53,7	-20,2	-31,2	nf	nf	nf	nf
		ASA1177R	24	100	29,1	29,1	54,9	56,4	-21,1	-37,8	nf	nf	nf	nf
Zeltner et al., 2009	Glutenin system	Pr.GluteninF	21	100	38,1	38,1	53,9	48,4	-19,3	-29,5	nf	nf	nf	nf
		Pr.GluteninR	19	71	63,1	63,1	60,9	60,3	-21,5	-35,9	nf	nf	sim (R X R)	nf
	Glutenin system	tritprglut	21	-	52,3	-	61,4	-	-23,1	-	nf	nf	nf	nf
		tritprglut	21	-	57,1	-	62,0	-	-23,9	-	nf	nf	nf	nf
	Barley system 1	HVF	25	89	36,0	36,0	57,6	61,29	-23,0	-41,2	nf	nf	nf	nf
		HVR	25	-	36,0	-	57,6	-	-22,9	-	nf	nf	nf	nf
	Barley system 2	hor1	19	87	57,8	57,8	60,9	59,1	-22,0	-33,5	nf	nf	nf	nf
		hor2	20	100	60,0	60,0	65,6	60,1	-23,2	-34,0	nf	nf	nf	nf
	Oat system	OATF	20	91	55,0	55,0	60,6	59,2	-22,2	-34,8	nf	nf	nf	nf
		OATR	19	82	52,6	52,6	58,7	58,7	-20,9	-33,3	nf	nf	nf	nf
Valores médios			22	88	49,4	49,4	60,7	61,0	-23,4	-37,3	nf	nf	2	nf

*Dados retirados dos artigos. **Dados retirados do software NETprimer - Input primer sequences error. nf: Não formou. Classificação é baseada no cálculo Rating = 100 + (ΔG (Dimer) * 1.8 + ΔG (Hairpin) * 1.4)(NETPRIMER, 2022). MFE: MFEprimer - <https://mfeprimer3.igenetech.com/spec>. NETpr: NETprimer - <http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimerServlet> .

O NETprimer apresentou uma limitação na análise de primers degenerados por não conseguir fazer a sua avaliação, o que não ocorreu com o MFE. Também observou-se uma diferença, entre os dois algoritmos, na detecção da formação de dímeros, sendo identificado apenas pelo MFE nos primers “Tri25-F” e “Pr.GluteninR” (Tabela 3 e Figura 1). Ambos formaram auto dímero (Tabela 3). Essas interações secundárias competitivas com outros pares de primers ou DNA modelo diminuem a eficiência da PCR (VALLONE E BUTLER, 2004). Ademais, os fragmentos iniciadores que sinalizaram a possibilidade de formar dímeros podem ser uma opção para ser utilizado com sondas, uma vez que, as mesmas só produzem um sinal fluorescente se tiverem hibridização específica com a sequência de DNA alvo. Desta forma, os dímeros de primer ou outros produtos de amplificação inespecíficos não produzem sinal (MUJICO *et al.*, 2011).

Dimer 1: P1 x P1	Tri25-F Martin-Fernández et al., 2015
Score: 7, $T_m = 8.05$ °C, $\Delta G = -5.87$ kcal/mol	
TGAAGTGAAGTCCATTGCTGAGCA Tri25-F :::::::::: Tri25-F ACGAGTCGTTACCTGAAGTCAAGT	
Dimer 1: P2 x P2	Pr. GluteninR Zeltner et al., 2009
Score: 8, $T_m = 16.87$ °C, $\Delta G = -7.34$ kcal/mol	
GCCCGGTTAGAAGGATCCT GluteninR :::::::::: GluteninR TCCTAGGAAGATGGGCCCG	

Figura 1. Representação esquemática dos dímeros formado pelos primer forward Tri25-F e reverse PR.GluteninR.

Considerando as características dos 23 pares de iniciadores determinadas pelos dois *softwares* utilizados neste estudo pode-se inferir que após a triagem o conjunto de primers que teria maior eficiência e acurácia na amplificação e detecção do glúten e/ou alergênicos é o “Wheat-w-Gliadin” - TAG2315F e TAG2473R, descrito no trabalho de Sandberg e colaboradores (2003). Apresentou valores de conteúdo GC, T_m , ΔG e pb dentro dos limites ótimos para a técnica de PCR em tempo real, bem como a maior classificação (100) (Tabela 3). Além disso, não se observou a possibilidade de formação de estruturas secundárias como dímeros e grampos que fez com que tivesse o valor máximo de classificação, já que o cálculo leva em consideração esses dois quesitos (Item 2.1).

Vallone e Butler (2004) afirmam que selecionar sequências curtas de oligonucleotídeos de DNA que possuem a capacidade de se ligar apenas ao seu alvo pretendido é de grande importância no desenvolvimento de tecnologias de detecção baseadas em ácidos nucleicos. Outro par de oligonucleotídeo que também apresentou potencial para uso em PCR é o “Agglutinin isoelectin” - Tri18-F e Tri18-R (MARTÍN-FERNÁNDEZ *et al.*, 2015) que apresentou ótimos parâmetros, no entanto, obteve classificação mais inferior (83,5) ao citado anteriormente. A capacidade e a possibilidade de rastrear rapidamente conjuntos de potenciais oligômeros em relação a sua reatividade cruzada reduz o tempo geral de desenvolvimento do ensaio (VALLONE E BUTLER, 2004) e garante maior confiabilidade dos resultados. Em suma, o uso de um *software* adequado é a estratégia ideal de automatizar as etapas na PCR e minimizar erros (FRÖDER, 2022).

2.2 Avaliação qualitativa e validação de primers para detecção de glúten em carne fraudada artificialmente

Para uma primeira avaliação do desempenho e sensibilidade da PCR em tempo real com os primers “Tritprglut”, “W.F1/W.R1” e “Planta 18S”, ensaios preliminares foram realizados com diluições seriadas (1:4) dos extratos de DNA de carne bovina artificialmente contaminada com 10% de farinha utilizando o kit QuantiNova Sybr Green (Tabela 4). No teste inicial, os primers “W.F1/W.R1” publicados por Mujico e colaboradores (2011) apresentaram menores valores de Cq e maior sensibilidade na constatação do glúten, comparado ao da “tritprglut” (ZELTNER *et al.*, 2009) e ao gene de referência, detectando concentrações inferiores as determinadas nas legislações para alimentos *free glúten*, que é <20 mg/kg (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados dos valores Cq da avaliação qualitativa dos primers tritprglut e W.F1/W.R1 e do gene de referência planta 18S.

Concentração glúten mg/kg	Valor Cq			
	Tritprglut*	W.F1/W.R1	Planta 18S	Teor glúten**
100000	30.40	11.18	11.83	alto
25000	31.45	11.99	12.96	alto
6250	33.29	13.96	14.80	alto
1560	35.48	16.02	16.77	alto
390	36.43	18.40	18.86	alto
97	38.79	20.03	20.66	baixo
24	nd	22.18	22.98	baixo
6,1	nd	25.68	nd	traço

*amplifica o gene da glutenina. **ISDI, 2018; FAO; WHO, 2022. ND= não determinado.

No entanto, o conjunto de iniciadores “tritprglut” foi escolhido para continuar as análises por amplificar o gene específico do glúten. O “W.F1/W.R1” amplifica os genes 25S e 18S rRNA positivando para presença ou ausência de células vegetais, ou seja, ele abrange a detecção de outros alergênicos provenientes dos cereais além do glúten. Fato que é justificável pelos valores de Cq próximos do primer de referência, com Cq médio de 17.43 e 16.98 para os oligonucleotídeos “W.F1/W.R1” e planta 18S, respectivamente. Em uma análise para verificação da presença de alergênicos de cereais total seria o conjunto de primer com maior potencial entre os analisados.

O limite de detecção do “tritprglut” se deu até o “teor baixo de glúten” (20 – 100 mg/kg) e apresentou um Cq médio de 34.30. Todos os primers testados, “tritprglut”, “W.F1/W.R” e o referência “18S”, apresentaram uma boa amplificação (Figura 2) e possuem qualificação para a detecção de glúten e/ou alergênicos originados de cereais em alimentos.

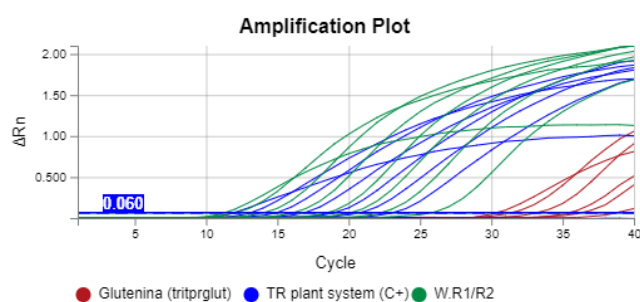


Figura 2. Perfil de amplificação dos genes específico da glutenina (vermelho), 18 S e 25S rRNA (W.F1/W.R)(verde) e do gene de referência (azul) em amostra de carne bovina artificialmente contaminados com 10% de glúten através do mastermix contendo SYBR Green.

Para validar o protocolo qualitativo e as condições de análise em matriz alimentar, cinco carnes de referência certificadas de diferentes espécies animais foram artificialmente contaminadas com 5% de glúten. Em todas as amostras o resultado foi positivo para presença do glúten. Observou-se que o valor de detecção Cq permaneceu numa mesma faixa, com valor médio de 25.69 (Tabela 5) e controle positivo (sistema planta) detectado num valor Cq médio de 11.70 (Figura 3). A proximidade dos valores de Cq entre os diferentes tipos cárneos mostra que a matriz do alimento não interferiu no processo de extração e amplificação do DNA do glúten, uma vez que, a composição físico-química e o perfil de ácidos graxos apresentaram diferenças entre diferentes espécies (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Tabela 5. Detecção qualitativa do alvo glutenina empregando diferentes carnes contaminadas artificialmente com 5% de glúten.

ID da amostra	Matriz cárnea	Valor Cq
8a	bovino	25.71
8b		25.06
9a	frango	25.72
9b		25.83
10a	suíno	25.56
10b		26.17
11a	cavalo	25.57
11b		25.06
12a	ovino	25.92
12b		26.26

Estabelecendo-se um limiar de detecção (*threshold line*) de 0.030, a curva de amplificação dos sistemas glutenina (vermelho) e do controle positivo da planta (18S) (verde) apresentaram valores Cq próximos, partindo praticamente no mesmo ponto, como apresentado na figura 3. Isso é importante na avaliação e interpretação dos dados da PCR em tempo real, pois o DNA extraído das carnes devem ser diluídos numa concentração baixa, já que altas concentrações podem prejudicar o funcionamento da enzima DNA polimerase presente na reação de PCR. Neste estudo, o valor Cq obtido é referente a concentração total de 20 ng/uL/reação de qPCR.

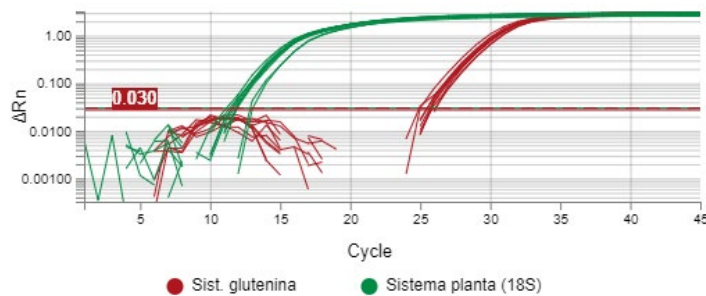


Figura 3. Detecção qualitativa do DNA extraído de cinco carnes de diferentes espécies animais, artificialmente contaminados com 5% de glúten, através do mastermix contendo SYBR Green.

Para Fröder (2022), a análise de DNA alimentar é uma ferramenta que pode identificar os ingredientes do produto, revelar a composição do produto, além de ajudar a rastrear possíveis fraudes e adulterações. Portanto, há necessidade de um diagnóstico rápido para os serviços de inspeção de alimentos e vigilância sanitária.

3.3 Análises de alimentos processados por qPCR

A eficiência de amplificação do ensaio de qPCR utilizando os primers “tritprglut”, para amplificar o gene da glutenina, foi determinada analisando o DNA de 100 ng/μL, diluído seriadamente (1:4) em água até a concentração de 0,0015 ng/μL totalizando nove pontos, em triplicata. Um ponto foi retirado para o melhor ajuste da curva. A partir do valor Cq obtido foi plotado um gráfico contra o logaritmo da concentração de DNA (Figura 4). A curva apresentou um coeficiente de correlação linear ($R^2 = 0,989$), com *slop* (inclinação) de -3.283, correspondendo a uma eficiência de amplificação de 101,65%. A curva padrão apresentou parâmetros consideráveis para ser utilizada no processo de quantificação do glúten em alimentos processados e industrializados por qPCR.

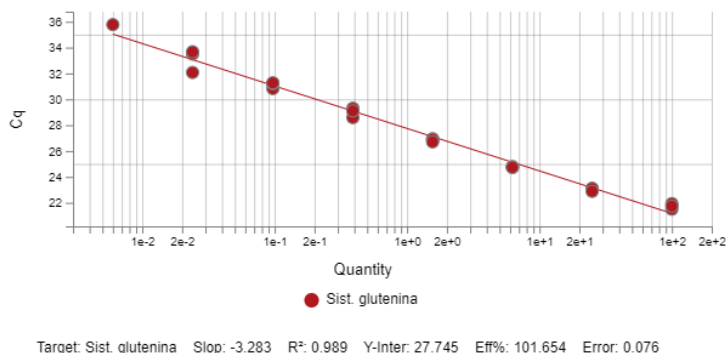


Figura 4. Eficiência da curva padrão de glúten obtida a partir da amplificação do gene da glutenina através do mastermix contendo SYBR Green (100 ng/uL - 0,00015 ng/uL).

Para a validação do ensaio quantitativo, foram adquiridos no comércio local diferentes produtos processados e industrializados classificados como “sem glúten”, “pode conter glúten” e “contém derivados de trigo e soja” (Tabela 2). A figura 5 mostra as curvas de amplificação das amostras de DNA dos diferentes alimentos processados e industrializados.

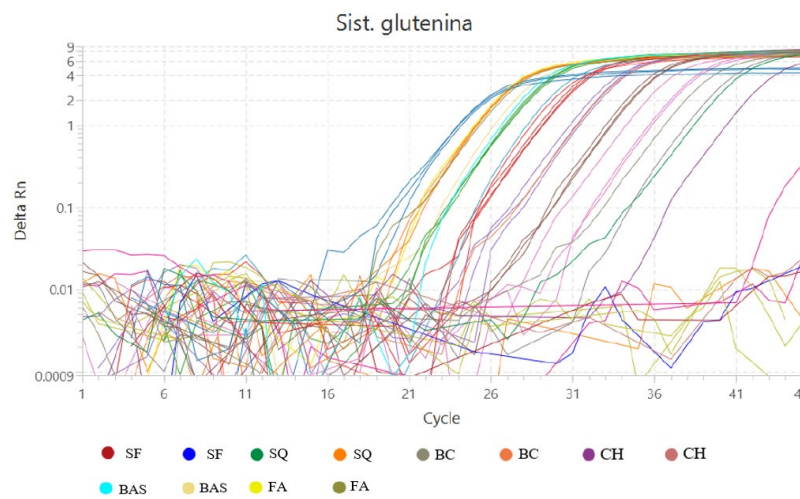


Figura 5. Curva de amplificação do gene alvo glutenina de alimentos processados e industrializados através do mastermix contendo SYBR Green. SF= snacks food; SQ= snacks queijo; BC= barra de cereal; CH= chocolate; BAS= biscoito água e sal; FA= farinha de trigo (controle positivo).

Com a técnica de qPCR foi possível detectar e quantificar a concentração de glúten nos alimentos analisados. Do total de 5 matrizes alimentares investigadas, apenas uma (20%) apresentou não conforme com a classificação indicada no rótulo. Pode-se observar, na tabela 6, que a barra de cereal possuía uma concentração de 1.925 mg/kg de glúten, sendo assim classificado como “alto teor”. No entanto, no rótulo (Tabela 2) o fabricante informa apenas que o produto “pode conter glúten”. Essa informação pode conduzir o consumidor a uma confusão no momento da compra, uma vez que, pode ser entendido que se o glúten estiver presente seria a nível de “baixo teor” (20 a 100 mg/kg), podendo até ser caracterizado como fraude. Segundo a norma alimentar IFS (padrão internacional para alimentos), versão 7, de outubro de 2020, fraude em alimentos é “a substituição intencional, rotulagem enganosa, adulteração ou falsificação de alimentos de matérias-primas ou materiais de embalagem disponibilizados no mercado para fins de ganhos econômicos” (IFS FOOD, 2020, p. 135). Desde que o comércio de alimentos foi introduzido, as fraudes alimentares existem e a maioria tem o propósito de obter benefícios financeiros através de enganos e danos aos consumidores e/ou de não conformidades ou de violações da lei alimentar feita por autoridades oficiais de controle (VISCIANO & SCHIRONE, 2021).

Uma possível justificativa para a elevada concentração de glúten na barra de cereal é a presença de aveia laminada na sua composição. A positividade para o glúten pode ser atribuída a uma contaminação cruzada durante o cultivo, colheita e processamento de grãos de cereais

(GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2019). Por esse motivo, a aveia foi incluída entre os alérgenos obrigatórios nos regulamentos europeus, além de que, é discutida a alta tolerância de pacientes celíacos, em torno de 80% dessa população, às prolaminas da aveia (COMINO *et al.*, 2015; FRIC *et al.*, 2011). García-García e pesquisadores (2019) relataram amplificação positiva de 19 (79%) amostras de alimentos contendo aveia em ensaio com PCR em tempo real e concluíram que existe uma elevada proporção de produtos à base de aveia mostrando contaminação por trigo, cevada e/ou centeio. Além desses, outros 11 alimentos também foram detectados a presença dos cereais-alvo ofensivos.

Tabela 6. Detecção quantitativa (qPCR) do gene alvo glutenina de alimentos processados e industrializados através do mastermix contendo SYBR Green.

Alimento	Tritprglut				
	%	mg/kg	Média mg/kg	Classificação*	Rotulagem
Barra de cereal	0,009	90	1.925	Alto teor	Não conforme
	0,376	3.760			
Biscoito água e sal	9,057	90.570	105.835	Alto teor	Conforme
	12,101	121.100			
Chocolate	0,001	10	5	Sem glúten	Conforme
	-	-			
Snacks food	-	-	-	Sem glúten	Conforme
	-	-			
Snacks queijo	0,003	30	15	Sem glúten	Conforme
	-	-			
Farinha**	32,514	325.140	287.370	Alto teor	Conforme
	24,960	249.600			

*Valor de referência <20 mg/kg – sem glúten; 20 a 100 mg/kg – baixo teor; >100 mg/kg – alto teor.

**Utilizado para a confecção da curva e como controle positivo.

Os demais alimentos estavam em conformidade com as classificações descritas no rótulo do produto. Todos os alimentos com rotulagem de precaução indicando sem glúten analisados neste estudo apresentaram resultados negativos. Esses resultados, juntamente com os encontrados por García-García e colaboradores (2018; 2019) e Pegels e colaboradores (2015), revelam que uma baixa porcentagem de alimentos com identificação de alergênicos contém de fato o ingrediente nocivo, causando restrições desnecessárias na escolha alimentar de indivíduos sensíveis.

A partir dos valores de Cq da curva padrão, que variou de 100 ng/uL - 0,00015 ng/uL, foi determinado o limite de detecção (LD) e o de quantificação (LQ). O LD resultou em um sinal de fluorescência dentro de um Cq de 36 ciclos. A concentração de 0,0015 ng/uL não foi considerada no cálculo por ter tido um Cq indeterminado. Para Druml e colaboradores (2015), o limite de 37 ciclos é definido na rotina analítica a fim de diminuir a probabilidade de obtenção de sinais falsos-positivos devido à reação cruzada. Ademais, ENGL (2015) estabeleceu em seu estudo um LD95% que é suficiente para detectar a presença do analito em pelo menos 95% do

tempo, tendo a probabilidade de resultados falsos-negativos de apenas de 5%. No ensaio realizado por García-García e colaboradores (2019) foi determinado a capacidade de detecção de até 10 mg/kg (0,001%) dos cereais alvo, obtendo valores de Cq de aproximadamente 32 e 35 ciclos. O LQ determinado no presente estudo foi de 60 mg/kg que se enquadra dentro do limite de classificação de baixo teor. Valores abaixo dessa concentração não são exatos e confiáveis. Pöpping e Holzhauser (2004) compartilham a informação de que para a Sociedade Alemã de Alergologia um método analítico adequado para detecção de glúten deve possuir uma sensibilidade de 10 mg/kg, valor seis vezes menor do que encontrado nesse estudo.

Na busca por resultados mais acurados e próximos da realidade do alimento, realizou-se o mesmo teste utilizando o corante Eva Green para verificar qual corante seria mais adequado para a detecção do glúten. Observa-se na figura 6 que a amplificação usando esse corante como alternativa não foi eficiente e para construção da curva padrão foi necessário excluir diversos pontos que ficaram fora da linearidade. Constatou-se valores da inclinação (*slope*) de -2.009, coeficiente de correlação (R^2) de 0.604 e a eficiência de amplificação (Eff.) de 214.604%. Todos os parâmetros ficaram totalmente fora dos valores ideais para quantificação, permitindo concluir que o corante Eva Green não é uma opção que pode ser utilizada nesse tipo de análise.

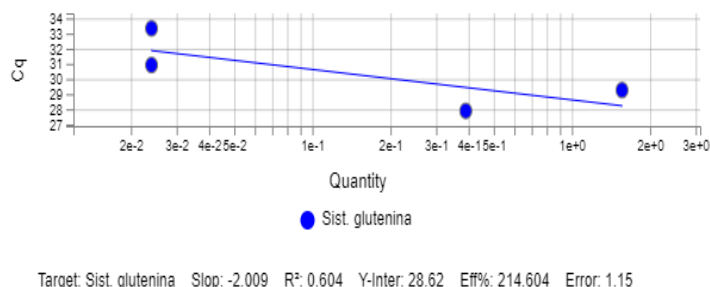


Figura 6. Eficiência da curva padrão de glúten obtida a partir da amplificação do gene da glutenina através do mastermix contendo Eva Green (100 ng/uL - 0,00015 ng/uL).

O corante Eva Green apresentou uma fluorescência muito elevada comparada ao SYBR Green (Figura 6) que pode ter levado a baixa qualidade dos resultados. A diferença nos valores de ΔR_n máximo entre os dois corantes foi muito elevada sendo 9.00 para o SYBR Green, em ambos os primers, e 2.0×10^6 e $< 1.0 \times 10^6$ para o Eva Green para a amplificação do gene da glutenina e 18S rRNA (gene referência), respectivamente (figura 7). Os valores de Cq das amostras de alimentos processados e industrializados também não tiveram precisão.

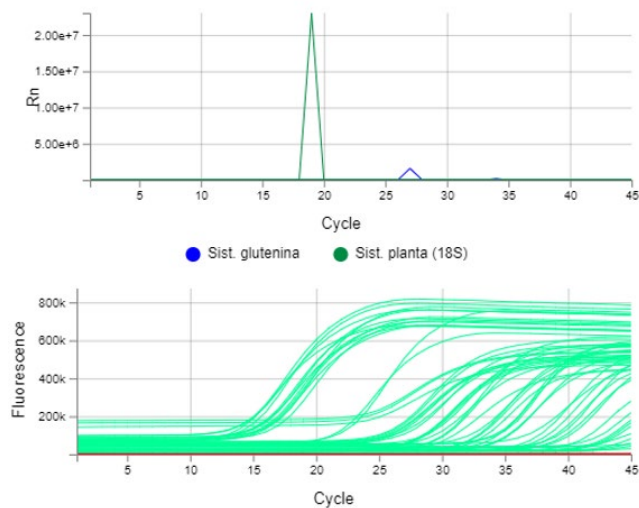


Figura 7. Gráficos multicomponente obtido empregando o mastermix contendo o corante Eva Green.

Diante desses resultados, sugere-se que o fluorogênico SYBR[®] Green é o mais indicado, comparado com o Eva Green, para análises de detecção de glúten em matriz alimentar complexa. Em um estudo conduzido por Andersen e pesquisadores (2006), mostrou não ter diferença significativa nos resultados de amplificação entre quatro diferentes químicos, SYBR[®] Green, Taqman, sonda MGB e molecular beacon, utilizados para reação de qPCR.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a discussão apresentada por García-García e colaboradores (2019) em que os autores destacam a sensibilidade e robustez da técnica de PCR em tempo real para detectar, em alimentos, a presença de concentrações potencialmente prejudiciais de cereais contendo glúten, apoiando os resultados dos ensaios imunológicos atualmente utilizados para esse objetivo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados, é possível destacar a possibilidade de implementação da PCR em tempo real como método complementar aos tradicionais, como o imunológico, na detecção quali-quantitativo de glúten em matriz alimentar complexa. Mas, para isso, é necessário a utilização de oligonucleotídeos iniciadores sensíveis e com características específicas para interação com o gene alvo. Após a triagem *in silico* o primer “Wheat-w-Gliadin” mostrou possuir maior potencial para ser utilizado na detecção do glúten em alimentos. Mesmo que as sequências de primers sejam obtidas de publicações internacionais, é necessária uma avaliação prévia, *in silico*, para garantir maior eficiência e precisão nas análises moleculares. Esse rastreamento em relação aos parâmetros de especificidade, principalmente em relação a uma

possível reatividade cruzada, pode reduzir o tempo geral de análise e garantir maior acurácia dos resultados.

Além disso, o primer testado (Tritprglut) mostrou ser eficiente na detecção de glúten mesmo em matrizes alimentares particularmente complexas, como chocolate e barra de cereal. O oligômero apresentou especificidade pelo gene alvo em diferentes amostras de carne contaminadas artificialmente, obtendo resultados próximos ao da porcentagem de contaminante inserida na amostra. Apresentou um LD próximo ao ótimo que seria de 37 ciclos e um LQ determinado de 60 mg/kg, estando dentro da faixa de classificação “Baixo teor”, estando um pouco acima do recomendado que seria de 10 mg/kg. Dos alimentos testado, apenas a barra de cereal apresentou não conformidade em relação a classificação presente na rotulagem. Fato esse, que pode ser justificado pela presença de aveia em floco na sua composição que esta sujeita a contaminação cruzada. Como perspectivas futuras, pretende-se testar os primers que tiveram os melhores resultados na análise *in silico* para verificar a possibilidade de detecção em níveis ainda mais baixo de glúten do que obtidos neste estudo.

5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. V. P.; CELLUPI NETO, R.; FREITAS, R. J. S. D.; WASZCZYNSKYJ, N., STERTZ, S. C.; & ROSA, M. I. S. Composição físico-química e perfil de ácidos graxos em carnes diferenciadas, bovina e suína. **Higiene alimentar**, p. 159-164, 2009.

ALLMANN, M.; CANDRIAN, U.; HÖFELEIN, C. et al. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food Detection of wheat contamination in non-wheat food products. **Z Lebensm Unters Forch**, v. 196, p. 248–251, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF01202741>

AMIGO, C. D.; POPPING, B. Labeling regulations, detection methods, and assay validation. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 2, p. 337-348, 2012.

ANDERSEN, C. B.; HOLST-JENSEN, A.; BERDAL, K. G.; THORSTENSEN, T.; TENGS, T. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9658-9663, 2006.

BRASIL. **Instrução Normativa - IN N° 75, de 8 de outubro de 2020**. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3882585/IN_75_2020_COMP.pdf/e89784b5-ed18-4bdd-a4d4-139724a56d4d. Acesso em: 05 mar. 2022.

BRASIL. **Resolução Da Diretoria Colegiada – RDC N° 429, de 08 de outubro de 2020**. Dispõe sobre a rotulagem nutricional dos alimentos embalados. Disponível em:

http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3882585/RDC_429_2020_.pdf/9dc15f3a-db4c-4d3f-90d8-ef4b80537380. Acesso em: 12 dez. 2022.

BRASIL. **Resolução Da Diretoria Colegiada – RDC N° 26, de 02 de julho de 2015**. Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2015/rdc0026_26_06_2015.pdf. Acesso em: 03 mai. 2022.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; WITWER, C. T. **The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments**, p. 611-62, 2009.

COMINO, I.; MORENO, M. D. L.; SOUSA, C. Role of oats in celiac disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 41, p. 11825–11831, 2015. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11825>.

COSTA, J.; AMARAL, J. S.; GRAZINA, L.; OLIVEIRA, M. B. P.; MAFRA, I. Matrix-normalised real-time PCR approach to quantify soybean as a potential food allergen as affected by thermal processing. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1843-1850, 2017.

DRUML, B., MAYER, W., CICHNA-MARKL, M., & HOCHEGGER, R. Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration. **Food Chemistry**, v. 178, p. 319-326, 2015.

ENGL, European Network of GMO Laboratories. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. JRC Technical Report, 2015.

FARAGE, P.; ZANDONADI, R. P.; GANDOLFI, L.; PRATESI, R.; FALCOMER, A. L.; ARAÚJO, L. S.; NAKANO, E. Y.; GINANI, V. C. **Accidental gluten contamination in traditional lunch meals from food services in Brasilia** *Nutrients*, v. 11, p.1924, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. Risk Assessment Of Food Allergens Part 1: Review And Validation Of Codex Alimentarius Priority Allergen List Through Risk Assessment. Meeting Report. Food Safety and Quality Series No. 14, 2022. Rome. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cb9070en/cb9070en.pdf>. Acesso em 24 abr. 2022.

FRIC, P.; GABROVSKA, D.; NEVORAL, J. Celiac disease, gluten-free diet, and oats. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 2, p. 107–115, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010>.

FRÖDER, H. **Detecção de espécies animais utilizando PCR em tempo real (qPCR) para verificar fraudes em produtos cárneos processados**. 2022. Trabalho de conclusão de curso (Ciência e Tecnologia de Alimentos). UERGS, Encantado - RS.

GARCÍA-GARCÍA, A.; MADRID, R.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R.; GONZÁLEZ, I. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for screening of wheat, barley, rye and oats in foods. **Food Control**, v. 84, p. 268–277, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.037>.

GARCÍA-GARCÍA, A.; MADRID, R.; SOHRABI, H.; DE LA CRUZ, S.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R.; & GONZÁLEZ, I. A sensitive and specific real-time PCR targeting DNA from wheat, barley and rye to track gluten contamination in marketed foods. **LWT**, 114, p. 108378, 2019.

GARRIDO-MAESTU, A.; AZINHEIRO, S.; FUCIÑOS, P.; CARVALHO, J.; PRADO, M. Highly sensitive detection of gluten-containing cereals in food samples by real-time Loop-mediated isothermal AMPLification (qLAMP) and real-time polymerase chain reaction (qPCR). **Food chemistry**, v. 246, p. 156-163. 2018.

HENTERICH, N.; OSMAN, A. A.; MÉNDEZ, E.; MOTHESS, T. Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. **Food/Nahrung**, v. 47, n. 5, p. 345-348, 2003.

INTERNATIONAL SPECIAL DIETARY FOODS INDUSTRIES (ISDI). Guidance On Gluten-Free Labelling Medical & Adult Dietetic Nutrition Based on Standard For Foods For Special Dietary Use For Persons Intolerant To Gluten Codex Stan 118-1979, 2018. Disponível em: <https://www.isdi.org/wp-content/uploads/2018/12/ISDI-Gluten-Free-07-final.pdf>. Acesso em: 03 mai. 2022.

IFS FOOD. **Norma para avaliar a conformidade de produtos e processos em relação à segurança de alimentos e qualidade**. 2020. Disponível em: https://www.ifs-certification.com/images/standards/ifs_food7/documents/standards/IFS_Food7_pt.pdf. Acesso em: 05 mar. 2022.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION/TECHNICAL SPECIFICATION. **ISO/TS 20224-4**. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of foodborne pathogens – Requirements for amplification and detection for qualitative methods. 1st.Edition, 2006.

KRYUCHENKO, E. V.; CHERNUKHA, I. M.; KUZLYAKINA, Y. A.; ZAMULA, V. S. Detection of unlabelled gluten in meat products and gluten-free flour by PCR and ELISA methods. In IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**, v. 854, n. 1, p. 012047, 2021.

KOERNER, T. B.; CLÉROUX, C.; POIRIER, C.; CANTIN, I.; ALIMKUÇOV, A.; ELAMPARO, H. Gluten contamination in the Canadian commercial oat supply Food Addit. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 6, p. 705 -10, 2011.

KOERNER, T. B.; CLÉROUX, C.; POIRIER, C.; CANTIN, I. La VIEILLE, S.; HAYWARD, S.; DUBOIS, S. Gluten contamination of naturally gluten-free flours and starches used by Canadians with celiac disease. **Food Additives and Contaminants**, v. 30, n. 12, p. 2017-21, 2013.

MARTÍN-FERNÁNDEZ, B.; COSTA, J.; OLIVEIRA, M. B. P.; LÓPEZ-RUIZ, B.; MAFRA, I. Screening new gene markers for gluten detection in foods. **Food Control**, v. 56, n. 57-63, 2015.

MARTÍN-FERNÁNDEZ, B.; COSTA, J.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; LÓPEZ-RUIZ, B.; OLIVEIRA, M. B. P.; MAFRA, I. High resolution melting analysis as a new approach to discriminate gluten-containing cereals. **Food Chemistry**, v. 211, p. 383-391, 2016.

MUJICO, J. R.; LOMBARDÍA, M.; MENA, M. C.; MÉNDEZ, E.; ALBAR, J. P. A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 795-801, 2011.

NETPRIMER. **Manual** **NetPrimer**.
<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimerServlet>. Acesso em 30/11/2022

PAULA-PENNA, M.; DOS SANTOS, P. P. B.; DOS SANTOS, A. L. S.; GODDARD, C. L.; DE SOUZA, S. V. C. Alimentos alergênicos sob a perspectiva regulatória: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, e7310111541-e7310111541, 2021.

PEGELS, N.; GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. Authenticity testing of wheat, barley, rye and oats in food and feed market samples by real-time PCR assays. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 867-875, 2015.

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

PINTO, A.; POLO, P. N.; HENRY, O.; REDONDO, M.; SVOBODOVA, M.; O'SULLIVAN, C. K. Label-free detection of gliadin food allergen mediated by real-time apta-PCR. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 2, p. 515-524, 2013.

PÖPPING, B.; HOLZHAUSER, T. **Dtsch Lebensmitt Rundsch**, v. 8, p. 285–293, 2004.

QIAGEN. **QuantiNova™ SYBR® Green PCR Handbook**. 2014. Disponível em: <https://www.qiagen-com.translate.goog/us/resources/resourcedetail?id=61d2de10-2b7c-472c-96d9-a818e200fbda&lang=en&x_tr_sl=en&x_tr_tl=pt&x_tr_hl=pt-BR&x_tr_pto=sc>. Acesso em: 23 fev. 2022.

QIAGEN. **DNeasy mericon Food Handbook**. 2020. Disponível em: <https://www.qiagen.com/gb/resources/resourcedetail?id=bd9cc2a8-aa71-4cb5-b6f7-97b3d7fc306d&lang=en>. Acesso em: 11 mar. 2022.

ROZEN, S; SKALETSKY, H. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers**. *Methods Molecular Biology*, v.132, p. 365-386, 2000.

SENA-TORRALBA, A.; PALLÁS-TAMARIT, Y.; MORAIS, S.; MAQUIEIRA, Á. Recent advances and challenges in food-borne allergen detection. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 132, p. 116050, 2020.

SANDBERG, M.; LUNDBERG, L.; FERM, M.; MALMHEDEN YMAN, I. Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. **European Food Research and Technology**, v. 217, n. 4, p. 344-349, 2003.

VALDES, I.; GARCIA, E.; LLORENTE, M.; MENDEZ, E. Innovative approach to lowlevel gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 5, p. 465–474, 2003

VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, 37(2), 226-231, 2004.

VISCIANO, P.; SCHIRONE, M. Food frauds: Global incidents and misleading situations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 424-442, 2021.

WANG, K., LI, H., XU, Y., SHAO, Q., YI, J., WANG, R., ... & QU, W. MFEprimer-3.0: quality control for PCR primers. **Nucleic Acids Research**, v.47, n. 1, p.610-613, 2019.

XHAFERAJ, M.; ALVES, T. O.; FERREIRA, M. S.; SCHERF, K. A. Recent progress in analytical method development to ensure the safety of gluten-free foods for celiac disease patients. **Journal of Cereal Science**, v. 96, p. 103114, 2020.

YILMAZ, R.; BAYRAÇ, C.; BAŞMAN, A.; KÖKSEL, H. Development of SYBR green-based real time PCR assays for detection and quantification of adulteration in wheat-based composite breads and their in-house validation. **Journal of Cereal Science**, v. 85, p. 91-97, 2019.

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**, v. 228, n. 3, p. 321-330, 2009.