

**MARIA REGINA BRANQUINHO**

**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**

**PPGVS / INCQS**

**FIOCRUZ**

**2010**

**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**

Maria Regina Branquinho

**Tese submetida para obtenção do título de Doutor  
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz**

Orientação: Dr<sup>a</sup> Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro  
2010

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: 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

Autor: Maria Regina Branquinho

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovado:

---

Prof. Dr. Victor Augustus Marin  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fiocruz

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Maisonnave Arisi  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Constança Britto  
Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz

Orientadora: \_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro  
2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Branquinho, Maria Regina

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 / Maria Regina Branquinho. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2010.

xix, 121 p., tab., fig.

Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadora: Paola Cardarelli Leite

1. Soja RR 2. OGM 3. PCR em tempo real 4. Método evento específico. I. Título

Quantitative evaluation of genetically modified soya in food by real-time polymerase chain reaction: development of an event-specific method

Aos meus pais Victor (*in memoriam*) e Maria Dora

Só tão alto quanto o que alcanço  
posso crescer,  
Só tão longe quanto exploro  
posso chegar,  
Só na profundidade para que olho  
posso ver,  
Só à medida que sonho  
posso ser.

(Karen Ravn)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Victor e Maria Dora, ao meu irmão Vitor Luis, aos meus sobrinhos Sabrina e Marcelo, aos meus pequenos João Vitor, Clara e Murilo, por sempre terem acreditado em mim;

A Paola Cardarelli Leite, pela orientação e grande amizade;

Às minhas amigas do Setor de Biologia Molecular, Renata, Érica e Suely, pela colaboração, paciência e carinho em todos os momentos;

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia e do INCQS e, em particular, aos amigos Célia, Silvana, Cláudia, Márcia, Esther, Carla, Eugênio, Maysa, Ivano, Cátia, Lúcia, Eliana, Carmen, pelo constante interesse, incentivo e ajuda nos momentos difíceis;

Às colegas da turma de doutorado de 2006, Márcia, Cláudia e Hilda, pelas inúmeras horas de alegria e companheirismo nos momentos de agonia;

A Maria Luiza Werneck, pela amizade e correção das referências bibliográficas;

Ao Sérgio Alves da Silva, pelos ensinamentos relativos às análises estatísticas;

À atual e à ex-chefe do Departamento de Microbiologia, Dras. Suely Fracalanza e Célia Romão, pela amizade e incentivo constante;

A todos os meus amigos, não pertencentes ao INCQS, que sempre me deram muito apoio para que eu realizasse esse trabalho;

Ao INCQS, na pessoa do diretor Dr. Eduardo Leal, pelo apoio durante o período de realização desse trabalho.

## RESUMO

A técnica de PCR em Tempo Real é uma poderosa ferramenta de quantificação de OGM em alimentos, mas ainda é muito influenciada por fatores como amostragem, eficiência da extração do DNA, presença de substâncias inibidoras da reação de PCR, pelo nível de degradação do DNA e pelo próprio genoma vegetal. Atualmente, a quantificação de soja GM está relativamente limitada ao uso de kits sendo um dos mais utilizados, o que tem como sequência alvo o promotor p35S. A quantificação de soja RR em matrizes complexas que possam conter esse elemento genético oriundo de outros vegetais pode resultar em falso positivos ou em níveis superestimados de OGM. O desenvolvimento de métodos evento específicos visa à quantificação dessas matrizes com maior confiabilidade. Este trabalho teve como objetivos principais o desenvolvimento de um método evento específico que tem como alvo a região de integração do p35S e o genoma da soja; a avaliação de alguns indicadores de desempenho e quantificação de duas matrizes com o método desenvolvido; a avaliação do desempenho do kit “TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection” que tem como alvo o p35S, utilizado na rotina; a determinação do conteúdo de OGM em alimentos processados pelo kit; e a avaliação do efeito de dois protocolos de extração de DNA na reação de PCR em tempo real. Os resultados mostraram que tanto o método de extração pelo CTAB como o kit DNeasy<sup>®</sup> (Qiagen) foram eficientes na extração de DNA das amostras de diferentes graus de processamento e que as análises comparativas das curvas analíticas da amplificação da lectina e do p35S não revelaram influência significativa dos métodos de extração na eficiência da PCR em tempo real. Os parâmetros de desempenho do kit de quantificação demonstraram linearidade, eficiência e sensibilidade e LOD em torno de 0,0125% e LOQ de 0,05%. A quantificação dos alimentos evidenciou a presença de soja RR com teores menores que 1% em 63,2% e teores maiores que 1% em 36,8% das amostras. O método evento específico desenvolvido para quantificação da soja RR apresentou linearidade, eficiência da PCR entre 86% e 109%, precisão na quantificação do número de cópias do MRC entre 3,6% e 12,7% e as medidas dos Cts foram altamente reprodutíveis. Os resultados da quantificação do teor de OGM nas amostras de biscoito, mistura de farinhas e no MRC 0,5%, utilizando os pares de iniciadores e sondas desenhados, demonstraram exatidão do método desenvolvido, indicando que devem prosseguir os estudos com outras matrizes com diferentes teores de soja RR para posterior validação. Este método vai possibilitar a quantificação diferenciada entre a soja RR e os dois eventos de soja tolerantes ao herbicida glifosinato de amônio, aprovados recentemente no Brasil, uma vez que o método utilizado no INCQS está baseado na amplificação do p35S que é utilizado na construção desses três eventos.

Palavras chave: soja RR – OGM – PCR em tempo real – método evento específico



## ABSTRACT

Real-Time PCR is a powerful tool for GMO quantification in food, but is influenced by factors such as sampling, DNA extraction methods, presence of PCR inhibitors, the degree of DNA degradation and by the plant genome. Currently, the quantification of GM soybean is relatively limited to the use of kits and one of the most used has as target sequence the promoter p35S. The quantification of RR soy in complex matrices that may contain this genetic element originated from other plants may result in false positives or overestimated levels of GMOs. The development of methods event specific aims at quantifying these matrices reliably. This work had as main goals the development of an event specific method targeting the p35S integration region/soybean genome; the evaluation of some performance criteria and quantification of some matrices using the developed method; the performance evaluation of the "TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit", targeting the p35S, used in the routine; the determination of the GMO content in foods using this kit; and the evaluation of the influence of two DNA extraction methods on the real time PCR. The results showed that either the extraction method by CTAB or DNeasy<sup>®</sup> kit (Qiagen) were efficient providing DNA from samples with different degree of processing, and the comparative analysis of lectin and p35S calibration curves did not reveal significant influence of the DNA extraction method on real time PCR efficiency. The performance criteria of the TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit indicated linearity, efficiency and sensitivity, LOD around 0.0125% and LOQ of 0.05%. Analysis of food samples revealed GMO contents ranging from 0.05 to 1% in 63.2% and more than 1% in 36.8% of samples. The event specific method developed for the quantification of RR soybeans was linear, showed PCR efficiency ranging from 86% to 109%, accuracy in quantifying the number of copies of the MRC from 3.6% to 12.7%, and the Cts values were highly reproducible. The results of the quantification of GMO content in samples of biscuit, mixture of flours and MRC 0.5%, using the primers and probes designed, demonstrated accuracy of the developed method indicating that studies should be continued with other matrices with different contents of RR soy for further validation. This method will enable the differential quantification between RR soybeans and the two others events of soybeans tolerant to ammonium glifosinate herbicide, approved in Brazil, since the method used in INCQS is based on the amplification of p35S, used in the construction of these three events.

**Keywords:** RR soybean – GMO – Real Time PCR – event-specific method

## LISTA DE SIGLAS

AFLP – Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Amplificados  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*  
CaMV – Vírus do Mosaico da Couve-flor  
CNBS – Conselho Nacional de Biossegurança  
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento  
CP4 EPSPS – Enzima 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (cepa CP4)  
CRL – *Community Reference Laboratory*  
CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança  
DNA – *Deoxyribonucleic Acid*  
ENGL – *European Network of GMO Laboratories*  
IBAMA – Instituto Brasileiro de Recursos Minerais Renováveis  
EC – *European Commission*  
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
GeMMA/CSL – *Genetically Modified Material Analysis Schemme/Central Science Laboratory*  
GM – Geneticamente Modificado  
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
IRMM – *Institute for Reference Materials and Measurements*  
JRC – *Joint Research Centre*  
LOD – Limite de Detecção  
LOQ – Limite de Quantificação  
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
MGBNFQ – *Minor Groove Binder Non-Fluorescent Quencher*  
MRC – Material de Referência Certificado  
OGM – Organismo Geneticamente Modificado  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
PTS – Proteína Texturizada de Soja  
RNV – Registro Nacional de Cultivares  
RR – Roundup Ready  
t-nos – terminador do gene da nopalina sintase  
VMDF – Vírus do Mosaico Dourado do Feijoeiro

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius  
CV – coeficiente de variação  
Ct – Ciclo *threshold*  
dNTPs – deoxinucleosídeos tri-fosfato  
DO – densidade ótica  
G - grama  
h – hora (s)  
IgA – imunoglobulina tipo A  
Kb – kilo bases  
Kg - quilograma  
KDa – kilodaltons  
L – litro  
log – logaritmo  
M – molar  
mg - miligrama  
mL – mililitro  
µL – microlitro  
mM – milimolar  
mm – milímetro  
µM - micromolar  
nM – nanomolar  
nm – nanômetro  
pb – pares de bases  
pg- picograma  
p/v – peso/volume  
SD – *standard deviation*  
Ti – Indutor de tumor  
Tm – *melting temperature*  
U – unidades  
V – volts

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na amplificabilidade dos vegetais .....	40
Tabela 2 - Resultados relativos à concentração, coeficiente de variação e pureza das preparações de DNA extraídos pelos dois métodos de extração.....	58
Tabela 3 - Resultados dos ensaios de verificação da presença de substâncias inibidoras em DNA de soja não GM.....	61
Tabela 4 - Parâmetros das curvas analíticas da amplificação de lectina e de p35S em preparações de DNA extraídos pelos dois métodos de extração.....	63
Tabela 5 – Principais características das curvas analíticas da quantificação de OGMs pelo “TaqMan GMO 35S Soy Detection kit”.....	65
Tabela 6 – Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação dos alvos lectina e p35S em cada concentração do MRC .....	66
Tabela 7 – Precisão da quantificação do MRC de soja 5% através da estimativa do número de cópias de lectina e de p35S .....	67
Tabela 8 – Precisão e exatidão da quantificação do MRC de soja RR .....	68
Tabela 9 – Dados obtidos na amplificação de diluições seriadas do MRC 5% utilizados para determinação do LOD e LOQ .....	69
Tabela 10 – Quantificação de amostras de alimentos utilizando o “TaqMan GMO 35S Soy Detection” kit”.....	70
Tabela 11 – PCR qualitativo com diferentes iniciadores do alvo soja RR.....	78
Tabela 12 – PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green com diferentes iniciadores do alvo soja RR .....	80
Tabela 13 – PCR em tempo real pelo sistema TaqMan com os iniciadores do alvo soja RR .....	82
Tabela 14 – Comparação dos Cts na amplificação do alvo RR utilizando-se o kit 35S e os iniciadores RR-R 147/RR-R 227 e sonda RR 182.....	83
Tabela 15 – PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green com diferentes iniciadores do alvo lectina .....	88
Tabela 16 – PCR em tempo real pelo sistema Taqman com diferentes iniciadores do alvo lectina .....	89
Tabela 17 - Comparação dos Cts na amplificação do alvo lectina utilizando-se o kit 35S e os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 com sonda Lec 1269 .....	91

Tabela 18 – Parâmetros das curvas analíticas na amplificação do alvo RR em diluições seriadas do MRC 5% .....	92
Tabela 19 – Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação do alvo RR em cada concentração do MRC .....	94
Tabela 20 – Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de soja RR utilizando os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 e sonda RR 182.....	94
Tabela 21 - Parâmetros das curvas analíticas na amplificação do alvo lectina em diluições seriadas do MRC 5%.....	96
Tabela 22 - Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação do alvo lectina.....	97
Tabela 23 - Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias do alvo lectina utilizando os iniciadores Lec-F 1218/Lec-F 1332 e sonda Lec 1269.....	97
Tabela 24 – Quantificação de amostras de alimentos pelo método desenvolvido.....	98

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do transgene da soja RR® .....	10
Figura 2 – Mapa do plasmídeo PV-GMGTO4 usado na transformação da soja RR .....	12
Figura 3 – Representação da ação da <i>Taq</i> DNA polimerase na sonda fluorogênica durante a fase de extensão da PCR .....	21
Figura 4 – Representação gráfica da amplificação por PCR em tempo real .....	24
Figura 5 – Rendimento médio dos dois métodos de extração (CTAB e DNeasy) em microgramas de DNA por 100 mg de amostra de alimentos.....	58
Figura 6 – Gel de agarose a 0,8% com as preparações de DNA das amostras de alimentos extraídas pelos métodos CTAB e DNeasy .....	60
Figura 7 – Curva analítica obtida pela média dos $\Delta$ Ct das 5 curvas versus o logaritmo das concentrações do MRC (0,1, 0,5, 1, 2 e 5% soja RR).....	65
Figura 8 – Gel de agarose a 2% da amplificação do MRC soja RR (pistas 4-8 iniciadores RR-F147/RR-R227 e pistas 10-16 iniciadores RR-F146/RR-R236) ..	77
Figura 9 - Gel de agarose a 2% da amplificação do alvo RR (pistas 4-9; 11-16) nas amostras de alimentos com iniciadores RR-F147/RR-R227 .....	77
Figura 10 - Curva de Dissociação do MRC soja RR, milho Bt176, Bt 11, GA21 MON810 e feijão GM após PCR em tempo real com os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 .....	80
Figura 11 - Curva de amplificação do MRC soja RR (0,1, 0,5, 1, 2 e 5%) pelo sistema TaqMan com os iniciadores RR-F 147/FF-R 227 e sonda RR 182.....	82
Figura 12 - Gel de agarose a 2% da amplificação do gene da lectina do MRC e de grãos de soja com os iniciadores LecF 1218/LecR 1332.....	85
Figura 13 - Gel de agarose a 2% da amplificação de lectina nas amostras de vegetais utilizando os iniciadores LecF 1218/LecR 1332.....	85
Figura 14 - Gel de agarose a 2% da amplificação de lectina (pistas 2-10 iniciadores LecF1218/LecR1332 e pistas 12-20 iniciadores MLecF/MLecR) em amostras de alimentos.....	86
Figura 15 – Curva de Dissociação do MRC de soja RR e outros vegetais após PCR em tempo real com os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 .....	87
Figura 16 – Curva de amplificação do MRC de soja RR e outros vegetais pelo sistema TaqMan com os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 e sonda Lec 1269.	89

Figura 17 – Curva analítica obtida com o log das concentrações do MRC de soja RR e os Cts de cada concentração (Ct RR) utilizando os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 e sonda RR 182.....	93
Figura 18– Curva analítica obtida com o log do número de cópias de lectina e os Cts de cada diluição (Ct lec) utilizando os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 e sonda Lec 1269.....	96

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 - Melhoramento genético convencional x biotecnologia moderna .....	1
1.2 - As culturas geneticamente modificadas no mundo e no Brasil .....	3
1.3 - Soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato .....	9
1.4 - A segurança da soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato .....	12
1.5 - Legislação brasileira de OGM .....	14
1.6 – Análise de alimentos .....	16
1.7 - Métodos de detecção e quantificação de OGM em alimentos .....	17
1.7.1– PCR competitivo .....	19
1.7.2 – Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (PCR em tempo real) .....	19
1.8 – Quantificação relativa de OGM por PCR em tempo real.....	25
1.8.1 – Quantificação de soja RR em alimentos .....	28
1.8.2 – Detecção de OGM em alimentos no Brasil .....	31
1.9 – Desafios e tendências na análise de OGM.....	32
1.10 – Justificativa e relevância do trabalho .....	33
<b>2 - OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
2.1 – Objetivo geral .....	35
2.2 – Objetivos específicos .....	35
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
3.1 – Origem dos DNA e amostras utilizadas nos estudos dos métodos .....	36
3.1.1 – Materiais de Referência Certificados (MRC).....	36
3.1.2 – Soja GM e não-GM .....	36
3.1.3 – Feijão geneticamente modificado .....	36
3.1.4 – Outros vegetais utilizados no estudo da especificidade .....	36
3.1.5 – Amostras de produtos contendo soja geneticamente modificada (GM) provenientes dos testes de proficiência providos pelo GeMMA/CSL/UK .....	37
3.1.6 – Amostras de alimentos analisadas para verificação da adequação da rotulagem à legislação vigente e para o estudo dos métodos de quantificação..	37
3.2 – Extração de DNA .....	37
3.3 – Verificação da amplificabilidade do DNA extraído dos vegetais utilizados na verificação da especificidade .....	39
3.4 – Reação em cadeia pela polimerase em tempo real utilizando o reagente “TaqMan <sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit” .....	40
3.5 – Avaliação de dois métodos de extração de DNA .....	41
3.5.1 – Amostras utilizadas na avaliação dos métodos .....	41
3.5.2 – Avaliação da concentração, rendimento e pureza do DNA .....	42
3.5.3 – Verificação da presença de substâncias inibidoras no DNA extraído do MRC 0% e em grãos de soja .....	42
3.5.4 – Avaliação dos métodos de extração na quantificação pela PCR em tempo real .....	43
3.6 – Avaliação dos parâmetros de desempenho do método que tem como alvo a região do promotor 35S (método de triagem) utilizando “TaqMan <sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit” .....	43
3.6.1 – Curvas analíticas e eficiência da amplificação .....	43
3.6.2 – Precisão e exatidão .....	44
3.6.2.1 – Reprodutibilidade das medidas dos Cts (precisão intercorridas) .....	44
3.6.2.2 – Reprodutibilidade do método na quantificação do número de cópias	



de lectina e de soja RR (precisão intercorridas) .....	44
3.6.2.3 – Repetibilidade (precisão intracorrida) e exatidão na quantificação relativa .....	45
3.6.3 – Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) absolutos e relativos .....	45
3.7 – Desenvolvimento do método de quantificação evento específico .....	45
3.7.1 – Seleção dos iniciadores e sondas para os alvos lectina e soja RR .....	45
3.7.2 – Avaliação da especificidade e sensibilidade dos iniciadores selecionados .....	46
3.7.2.1 – Espécies vegetais e amostras de alimentos .....	46
3.7.2.2 – PCR qualitativo para avaliação dos iniciadores da lectina e da soja RR .....	48
3.7.3 – Avaliação da especificidade dos iniciadores selecionados por PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green .....	49
3.7.4 - Avaliação da especificidade dos iniciadores selecionados por PCR em tempo real pelo sistema TaqMan .....	49
3.8 – Avaliação dos parâmetros de desempenho do método que tem como alvo a região evento específica pelo sistema TaqMan .....	50
3.8.1 – Otimização das concentrações dos iniciadores da reação de PCR em tempo real utilizando concentração fixa das sondas (250 nm) .....	50
3.8.2 – Curvas analíticas e eficiência da amplificação .....	50
3.8.3 – Reprodutibilidade das medidas dos Cts (precisão intercorridas) .....	51
3.8.4 - Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de soja RR (precisão intercorridas) .....	51
3.9 – Avaliação dos parâmetros de desempenho do método que tem como alvo o gene da lectina pelo sistema TaqMan .....	51
3.9.1 – Otimização das concentrações dos iniciadores da reação de PCR em tempo real utilizando concentração fixa das sondas (250 nm) .....	51
3.9.2 – Curvas analíticas e eficiência da amplificação .....	51
3.9.3 – Reprodutibilidade das medidas dos Cts (precisão intercorridas) .....	52
3.9.4 - Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de lectina (precisão intercorridas) .....	52
3.10 – Quantificação do teor de soja RR em duas matrizes de alimentos utilizando o método desenvolvido .....	52
3.11 – Quantificação de amostras de alimentos utilizando o “TaqMan® GMO 35S Soy Detection kit” .....	54
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
4.1 – Avaliação dos dois métodos de extração de DNA .....	55
4.1.1 – Extração de DNA: pureza e rendimento .....	55
4.1.2 – Verificação da presença de substâncias inibidoras nas extrações de DNA .....	60
4.1.3 – Avaliação dos métodos de extração de DNA na quantificação pela PCR em tempo real .....	61
4.2 – Avaliação dos parâmetros de desempenho do método que utiliza como alvo a região do promotor 35S (método de triagem) utilizando o “TaqMan® GMO 35S Soy Detection kit” .....	64
4.2.1 – Curvas analíticas e eficiência da amplificação .....	64
4.2.2 – Precisão e exatidão .....	65
4.2.2.1 – Reprodutibilidade (precisão intercorridas) das medidas dos Cts .....	65
4.2.2.2 - Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de lectina e de p35S (precisão intercorridas) .....	66

4.2.2.3 – Repetitividade (precisão intracorrída) e exatidão na quantificação relativa .....	67
4.2.3 – Limites de detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ) absolutos e relativos .....	68
4.3 - Quantificação de amostras de alimentos utilizando o “TaqMan® GMO 35S Soy Detection kit” .....	69
4.4 – Desenvolvimento do método de quantificação de soja RR cujo alvo é a região de integração do promotor 35S e o genoma da planta (quantificação evento específica) .....	72
4.4.1 – Seleção dos iniciadores e sondas para o alvos lectina e soja RR .....	72
4.4.1.1 – Seleção dos iniciadores e sondas para o alvo lectina .....	73
4.4.1.2 – Seleção dos iniciadores e sondas para o alvo soja RR .....	74
4.5 – Avaliação da especificidade e sensibilidade por PCR qualitativo, PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green e pelo sistema TaqMan, dos iniciadores para o alvo RR .....	76
4.5.1 – Avaliação da especificidade por PCR qualitativo .....	76
4.5.2 – Avaliação dos iniciadores por PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green .....	78
4.5.3 - Avaliação dos iniciadores por PCR em tempo real pelo sistema TaqMan .....	80
4.5.4 – Avaliação da sensibilidade amostras de alimentos contendo diferentes teores de soja RR .....	82
4.6 - Avaliação da especificidade e sensibilidade por PCR qualitativo, PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green e sistema TaqMan dos iniciadores para o alvo lectina .....	83
4.6.1 – Amplificabilidade dos DNAs extraídos dos vegetais .....	83
4.6.2 – Avaliação da especificidade por PCR qualitativo .....	84
4.6.3 - Avaliação dos iniciadores por PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green .....	86
4.6.4 - Avaliação dos iniciadores por PCR em tempo real pelo sistema TaqMan .....	88
4.6.5 - Avaliação da sensibilidade frente a amostras de alimentos .....	90
4.7 – Avaliação dos parâmetros de desempenho do método de quantificação de soja RR cujo alvo é a região de integração do promotor 35S e o genoma da planta (quantificação evento específica) utilizando os iniciadores RR-F147 / RR-R227 com a sonda RR 182 pelo sistema TaqMan .....	91
4.7.1 – Otimização da concentração dos iniciadores .....	91
4.7.2 – Curvas analíticas e eficiência da amplificação .....	91
4.7.3 – Reprodutibilidade das medidas dos Cts (precisão intercorridas) .....	93
4.7.4 - Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de soja RR (precisão intercorridas) .....	94
4.8 - Avaliação dos parâmetros de desempenho do método de quantificação de soja RR cujo alvo é o gene endógeno da lectina utilizando os iniciadores Lec-F1218 / Lec-R 1332 e a sonda Lec 1269 pelo sistema TaqMan .....	95
4.8.1 - Otimização da concentração dos iniciadores .....	95
4.8.2 - Curvas analíticas e eficiência da amplificação .....	95
4.8.3 – Reprodutibilidade das medidas dos Cts (precisão intercorridas) .....	96
4.8.4 - Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de lectina (precisão intercorridas) .....	97
4.9 – Quantificação do teor de soja RR em 02 matrizes de alimentos utilizando o método desenvolvido.....	98

<b>5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>102</b>
<b>6 – BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>106</b>

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – Melhoramento Genético Convencional x Biotecnologia Moderna

Durante a evolução da agricultura, tanto a seleção natural como a seleção artificial praticada pelo homem foi transformando as plantas silvestres em domesticadas e cultivadas, causando alterações nas suas características com ênfase para a perda natural das sementes, mudanças nas características reprodutivas e aumento do tamanho dos frutos e das sementes, entre outras. Como exemplo, pode-se citar a criação do milho pelos nativos da América, há 8000 anos, por meio da domesticação de uma planta selvagem chamada teosinte (FALK et al, 2002).

O melhoramento genético tradicional, especialmente o de sementes, sempre teve como objetivos principais o aumento da produtividade, o aumento da resistência a doenças e pragas e a melhoria das características de qualidade e nutricionais do alimento pronto para consumo. Enquanto esses métodos de melhoramento trouxeram um aumento significativo na produtividade de grãos nas últimas décadas, havia sempre a limitação da diversidade natural genotípica dentro das espécies bem como a incompatibilidade sexual entre as espécies, o que acarretava uma restrição ao uso potencial desses métodos (WHO, 2005). Além disso, um aspecto negativo é a ausência do controle em nível molecular dos genes após um evento de multiplicação, uma vez que para a obtenção do gene desejável ou a retirada daquele indesejável ocorre troca de partes inteiras ou fragmentos de cromossomos das plantas (FALK et al., 2002).

Com o desenvolvimento das técnicas de recombinação de DNA na década de 80, criou-se uma poderosa ferramenta que superou as limitações de incompatibilidade entre as diferentes espécies. A moderna biotecnologia emprega técnicas moleculares que identificam e selecionam sequências de DNA responsáveis pela expressão de determinadas características (por exemplo, tolerância a herbicidas, resistência a doenças e a fatores bióticos e abióticos) em um organismo doador (microrganismo, planta ou animal) e transferem as sequências a um organismo receptor para que ele passe a expressar aquela característica, sem a troca de partes de cromossomos como ocorre no cruzamento convencional de plantas. O termo Organismo Geneticamente Modificado (OGM) é definido pela legislação brasileira como sendo o organismo cujo material genético tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética (BRASIL, 2005).

Desde a manipulação dos genes em laboratório até chegar ao mercado, o desenvolvimento de uma planta transgênica envolve basicamente as seguintes etapas: disponibilização da característica (o gene), introdução do gene na planta de interesse, obtenção do evento (planta transgênica expressando a característica desejada), seleção, introdução nos programas de melhoramento, produção de sementes e o lançamento das sementes no mercado. Esse desenvolvimento ocorre paralelamente às etapas fundamentais da propriedade intelectual e biossegurança.

Vários métodos de transformação são utilizados para a transferência de DNA recombinante para a produção de um organismo geneticamente modificado. Nas plantas são utilizados os métodos de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (bactéria do solo que contém elementos genéticos de infecção de ampla variedade de espécies vegetais), e métodos de transferência direta de DNA para protoplastos através de tratamentos químicos, elétricos ou de biobalística (micro-partículas metálicas embebidas em DNA recombinante injetadas a alta velocidade) (NEWELL, 2000).

A infecção por *A. tumefaciens* foi o primeiro método utilizado na obtenção das plantas transgênicas, sendo que espécies dicotiledôneas como tabaco, batata, soja, canola e alfafa são transformadas por esta metodologia em que um fragmento do DNA do plasmídeo indutor de tumor (Ti), denominado T-DNA, é transferido para a célula vegetal. A construção de vetores derivados do plasmídeo Ti possibilitou a inserção e integração de sequências de DNA de interesse no genoma das plantas. Esta técnica possui alta eficiência de transformação e resulta em inserção de menor número de cópias e poucos rearranjos na planta (AGBIOS, 2009). A transferência direta de DNA, muito utilizada nas espécies monocotiledôneas como milho, trigo, arroz, pode ser resultante de tratamentos químicos ou elétricos a que são submetidos os protoplastos como tratamento por polietilenoglicol (PEG) e eletroporação. A aceleração ou bombardeamento de partículas, também conhecida como biobalística, é adequado tanto para as espécies mono como as dicotiledôneas e por este método fragmentos de DNA (plasmídeos ou DNA linearizados) adsorvidos à superfície de micropartículas de ouro ou de tungstênio são injetados a altíssimas velocidades contra as células-alvo vegetais e liberados no núcleo. Esta técnica pode resultar em inserção de vários números de cópias e produzir rearranjos nas sequências inseridas e no DNA da planta (AGBIOS, 2009).

O uso da biotecnologia produz resultados mais rápidos do que o melhoramento genético convencional como também possibilita alterações mais precisas já que

permite a seleção e transferência de um gene específico. Entretanto, em muitos casos, pode ocasionar uma inserção aleatória no genoma hospedeiro com consequente aparecimento de efeitos fisiológicos não intencionais. Esses efeitos também podem ocorrer no melhoramento genético convencional e o processo de seleção é direcionado para eliminá-los e estabelecer uma característica estável e benéfica (WHO, 2005).

## **1.2 – As culturas geneticamente modificadas no mundo e no Brasil**

Existem, atualmente, cerca de 144 diferentes eventos derivados de várias espécies vegetais comestíveis ou não, incluindo cereais, leguminosas, vegetais fibrosos, frutos, e plantas ornamentais aprovados em vários países. Entretanto, somente 15 diferentes espécies de plantas estão sendo comercializadas na forma de sementes para alimentação humana e/ou animal (AGBIOS, 2009; JAMES, 2009). A maioria foi modificada com o objetivo de aumento da tolerância a herbicidas e outros defensivos agrícolas, maior resistência a insetos, vírus e a doenças, melhoria da qualidade dos óleos e amadurecimento tardio.

Em 2009, a área global estimada de cultivo de plantas geneticamente modificadas (GM) autorizadas foi de cerca de 134 milhões de hectares compreendendo o plantio em 25 países sendo os produtores, em ordem decrescente os Estados Unidos da América (soja, milho, algodão, canola, abóbora, mamão papaia, alfafa, beterraba), Brasil (soja, algodão, milho), Argentina (soja, milho, algodão), Índia (algodão), Canadá (canola, milho, soja, beterraba), China (algodão, tomate, papaia, pimenta), Paraguai (soja), África do Sul (milho, soja, algodão), Uruguai (soja, milho), Bolívia (soja), Filipinas (milho), Austrália (algodão, canola), Burquina Faso (algodão), Espanha (milho), México (algodão, soja), Chile (soja, milho, canola), Colômbia (algodão), Honduras (milho), República Tcheca (milho), Romênia (milho), Portugal (milho), Alemanha (milho), Polônia (milho), Eslováquia (milho), e Egito (milho) (JAMES, 2009). Este número tende a aumentar tanto em termos de área cultivada como em termos de diversificação dos eventos desenvolvidos.

Além dessas culturas, outros vegetais comestíveis como trigo, arroz, batata, tomate, chicória, melão, ameixa, cana de açúcar, alfafa e outras plantas como tabaco, cravo e linho já receberam aprovação em alguns países, sem necessariamente estarem sendo comercializados (AGBIOS, 2009).

Durante o período de 1996-2008, de forma constante, a tolerância a herbicida foi a característica dominante, ocupando 63% da área global cultivada de soja, milho, canola, algodão e alfafa geneticamente modificados, seguida pela característica de resistência a insetos. Pela segunda vez em 2009, a combinação de duas ou três características (*stacked genes*) ocupou um percentual maior de área cultivada (22%) do que as culturas resistentes a insetos (15%) refletindo uma contínua tendência de participação crescente (23% de crescimento) das culturas com combinação de genes na área total cultivada com transgênicos. Em 2008, por exemplo, 78% de todo o milho geneticamente modificado plantado nos EUA eram constituídos de híbridos que possuem duas ou três características e espera-se a comercialização, em 2010, do milho SmartStax<sup>®</sup> contendo oito genes codificando várias características. O mesmo se passa em relação ao plantio de algodão geneticamente modificado contendo duas características, nos EUA, Austrália e África do Sul (JAMES, 2009).

Dentre as tendências atuais e futuras de desenvolvimento de vegetais geneticamente modificados para uso na alimentação humana, podem ser citados o desenvolvimento de novas características agrônômicas como a tolerância a outros herbicidas e combinação de vários herbicidas em milho, soja e canola; outros genes de resistência a insetos no milho Bt e resistência a vírus e nematódios em batata; e a alteração na composição e características nutricionais como o arroz contendo altos níveis de  $\beta$ caroteno e ferro (*Golden rice*); tubérculos com alto teor de proteínas e aminoácidos essenciais; mandioca com menores teores de ácido cianídrico; soja e canola com alteração no teor de ácidos graxos para produção de óleo com redução de gorduras saturadas; redução do stress ambiental. É também esperado que os futuros híbridos a serem desenvolvidos venham a apresentar tanto características agrônômicas como características nutricionais (WHO, 2005). Algumas variedades já estão disponíveis para comercialização como é o caso da soja com perfil modificado de ácidos graxos (Austrália, Canadá, Japão, Nova Zelândia), canola com esta mesma característica (Canadá, EUA), o milho com maior teor de lisina (Austrália, Canadá, Japão, Filipinas, EUA) (AGBIOS, 2009).

Tem sido demonstrado que as plantas também podem ser utilizadas como biorreatores para a produção em larga escala de proteínas recombinantes de interesse industrial e farmacêutico. As plantas transgênicas constituem um sistema de expressão capaz de produzir anticorpos completos funcionais além de apresentarem a possibilidade de produção em larga escala e custo mais reduzido. Isto foi demonstrado pela produção de um anticorpo monoclonal do tipo IgA em tabaco (RECH FILHO,

2004). As plantas transgênicas também estão sendo testadas para a produção de imunoterápicos, com relatos da expressão estável de antígenos vacinais em diferentes tecidos de plantas comestíveis ou não. Antígenos virais relacionados ao vírus Norwalk, vírus do papiloma humano, vírus da raiva, vírus da estomatite vesicular, entre outros, já foram expressos em tecidos de várias plantas. Em tabaco, a introdução do gene codificador da proteína de superfície do vírus da hepatite B (HBV), ligado a um promotor constitutivo, já possibilitou a indução de resposta imune *in vivo* pela proteína viral obtida nos extratos das folhas transformadas. A mesma estratégia foi utilizada na expressão de antígenos vacinais bacterianos como a toxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* enteropatogênica em batata, milho e tomate e toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae* em batata, tomate, arroz e folhas de tabaco. Os resultados até agora publicados sobre os ensaios clínicos (fase I) de vários antígenos vacinais (bacterianos e virais) obtidos em plantas apontaram como sendo seguros e indutores de boa resposta imune, sugerindo o enorme potencial das plantas transgênicas na indústria farmacêutica (TIWARI et al., 2009).

O Brasil é o 2º maior produtor mundial de soja, sendo este um dos componentes principais da pauta das exportações brasileiras. Na safra de 2008/2009 foram produzidos 57,090 milhões de toneladas de grãos numa área de 21,728 milhões de hectares sendo a produção de grãos dividida entre o consumo interno e exportações de grãos, farelo e óleo e sementes para alimentação humana. Em 2008 o Brasil exportou US\$ 18 milhões de grãos de soja, farelo e óleo, o que representou cerca de 9% das receitas cambiais (EMBRAPA, 2008).

Segundo projeções da CONAB, a safra brasileira de 2009/2010 será de cerca de 63,60 milhões de toneladas cultivadas em quase 23 milhões de hectares, sendo os maiores produtores o Estado do Mato Grosso seguido pelo Estado do Paraná, Estado do Rio Grande do Sul e Estado de Goiás (CONAB, 2009).

No Brasil, atualmente, já existem 21 culturas geneticamente modificadas (GM) que receberam parecer favorável da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para uso comercial (CTNBio, 2010).

A primeira cultura aprovada para consumo humano e para uso em ração animal foi a soja tolerante ao herbicida glifosato (soja Roundup Ready®), linhagem GTS 40-3-2, desenvolvida pela Monsanto do Brasil Ltda. O parecer técnico favorável foi emitido em 1998 pela CTNBio mas, devido aos muitos questionamentos jurídicos feitos por vários segmentos da sociedade, a sua comercialização só foi liberada a partir de 2003 através da Lei nº 10.688 para a safra de 2003 (BRASIL, 2003a), Lei nº 10.814 para a



safra 2004 (BRASIL, 2003b) e Medida Provisória nº 223 para a safra 2005 (BRASIL, 2004b). A Lei de Biossegurança, em 2005, autorizou definitivamente a produção e a comercialização de sementes de cultivares de soja geneticamente modificada bem como o plantio das sojas tolerantes ao glifosato registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNV) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005).

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e também baseado em informações do setor privado, em 2007/2008 foram plantados cerca de 11-13 milhões de hectares de soja RR (52-61% do total da área plantada com soja) correspondendo a aproximadamente 29-35 milhões de toneladas (EUROPEAN COMMISSION, 2009) sendo os maiores produtores os Estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Paraná e a região do cerrado nordestino.

Em dezembro de 2009, foi aprovado o plantio e a comercialização da soja tolerante ao herbicida do grupo químico das imidazolinonas (soja CV127, evento BPS-CV127-9) desenvolvida pela Basf S. A. e Embrapa soja, com uso proposto para consumo humano.

Em fevereiro de 2010 foram aprovados dois eventos de soja tolerante ao herbicida glifosinato de amônio: soja Liberty-Link (L.L.) evento A2704/12 e soja Liberty-Link evento A 5547-127, desenvolvidos pela Bayer S.A. para consumo humano.

A segunda cultura GM aprovada foi o algodão resistente a insetos da Ordem Lepidoptera (Algodão Bollgard evento 531) desenvolvido pela Monsanto do Brasil Ltda., sendo que o parecer favorável foi emitido em março de 2005. O uso proposto é o de produção de fibras têxteis, sementes para ração animal, óleo para consumo humano. Em 2007/2008, uma área estimada de 138-171 mil hectares foi plantada com algodão GM, correspondendo a 12-15% do total da área plantada com algodão. O rendimento total para todos os tipos de algodão foi de 1,5 milhão de toneladas, incluindo 211-261 mil toneladas de algodão GM (EUROPEAN COMMISSION, 2009).

Após 2007, mais cinco eventos de algodão GM foram aprovados incluindo dois híbridos:

- Algodão tolerante ao herbicida glifosinato de amônio (Algodão LibertyLink, evento LL25) desenvolvido pela Bayer S.A. O parecer favorável foi emitido em agosto de 2008 para uso na produção de fibras para a indústria têxtil e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.

- Algodão tolerante ao herbicida glifosato (algodão Roundup Ready® evento MON 1445) desenvolvido pela Monsanto do Brasil Ltda. O parecer favorável foi emitido em setembro de 2008 para uso na produção de fibras para a indústria têxtil e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.
- Algodão resistente a insetos (Algodão Bollgard II, evento 15985) desenvolvido pela Monsanto do Brasil Ltda. O parecer favorável foi emitido em maio de 2009 para uso na produção de fibras para a indústria têxtil e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.
- Algodão resistente a insetos e tolerante ao herbicida glifosinato de amônio (Widestrike) desenvolvido pela Dow AgroScience Industrial Ltda. O parecer favorável foi emitido em março de 2009 para o uso na produção de fibras para a indústria têxtil e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.
- Algodão resistente a insetos da ordem Lepidoptera e tolerante ao herbicida glifosato (algodão MON531 x MON1445) desenvolvido pela Monsanto do Brasil SA. O parecer favorável foi emitido em outubro de 2009 para uso na produção de silagem e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.

A partir de 2007, começou a ser aprovada a comercialização dos milhos geneticamente modificados, relacionados em ordem cronológica da emissão dos pareceres:

- Milho tolerante ao herbicida glifosinato de amônio (Milho LibertyLink, evento T25) desenvolvido pela Bayer S.A O parecer favorável foi emitido em maio de 2007 para uso na produção de milho para ração animal e para consumo humano do OGM e seus derivados.
- Milho resistente a insetos da Ordem Lepidoptera (Milho Guardian, evento MON810) desenvolvido pela Monsanto do Brasil Ltda. O parecer favorável foi emitido em agosto de 2007 para uso na produção de milho para ração animal e para consumo humano do OGM e seus derivados.
- Milho resistente a insetos da Ordem Lepidoptera (Milho Bt11) desenvolvido pela Syngenta Seeds Ltda. O parecer favorável foi emitido em setembro de 2007 para uso na produção de milho para ração animal e para consumo humano do OGM e seus derivados.
- Milho tolerante ao herbicida glifosato (milho GA 21) desenvolvido pela Syngenta Seeds Ltda. O parecer favorável foi emitido em setembro de 2008 para uso na

produção de silagem e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.

- Milho tolerante ao herbicida glifosato (milho Roundup Ready® evento NK603) desenvolvido pela Monsanto do Brasil Ltda. O parecer favorável foi emitido em setembro de 2008 para uso na produção de silagem e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.
- Milho resistente a insetos Ordem Lepidoptera e pragas (Herculex I, evento TC 1507) desenvolvido pela Dow AgroScience Industrial Ltda. O parecer favorável foi emitido em novembro de 2008 para uso na produção de silagem e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.
- Milho resistente a insetos da ordem Lepidoptera e tolerante ao herbicida glifosato (milho TC1507 x NK 603) desenvolvido pela Du Pont do Brasil SA. O parecer favorável foi emitido em outubro de 2009 para uso na produção de silagem e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.
- Milho resistente a insetos da ordem Lepidoptera (milho MON89034) desenvolvido pela Monsanto do Brasil SA. O parecer favorável foi emitido em outubro de 2009 para uso produção de silagem e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.
- Milho resistente a insetos da ordem Lepidoptera (milho MIR162) desenvolvido pela Syngenta do Brasil Ltda. O parecer favorável foi emitido em setembro de 2009 para uso na produção de silagem e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.
- Milho resistente a insetos da ordem Lepidoptera e tolerante ao herbicida glifosato (milho MON810 x NK 603) desenvolvido pela Monsanto do Brasil SA. O parecer favorável foi emitido em setembro de 2009 para uso na produção de silagem e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.
- Milho resistente a insetos da ordem Lepidoptera e tolerante ao herbicida glifosato (milho Bt11 x GA21) desenvolvido pela Syngenta Seeds LTDA. SA. O parecer favorável foi emitido em setembro de 2009 para uso na produção de silagem e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.

Em 2008/2009, aproximadamente 15 milhões de hectares de milho foram plantados, dos quais 1 milhão de hectares foi de milho GM, correspondendo a 5-17% do total plantado. O rendimento total de todos os tipos de milho foi de 55 milhões de toneladas incluindo 4,5 milhões de toneladas de milho geneticamente modificado.

Além dessas culturas, várias pesquisas vêm sendo realizadas no Brasil, tanto por empresas privadas como instituições públicas, no sentido de desenvolver outras espécies de vegetais geneticamente modificados para consumo humano tais como feijão resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF) (FARIA et al, 2006; BOMFIM et al., 2007), feijão resistente ao caruncho, algodão tolerante a herbicida e resistente a fungos e bactérias, batata resistente a vírus, mamão resistente ao vírus da mancha anelar, alface resistente a fungos, arroz resistente a fungos e com maior resistência a baixas temperaturas e à secura, cana de açúcar tolerante a herbicidas (SAMPAIO, 2005).

Já estão em avaliação na CTNBio os pedidos de aprovação de comercialização de outros eventos, entre eles o do arroz LL62 (LibertyLink rice), tolerante ao glifosinato de amônio, desenvolvido pela Bayer CropScience Ltda., o da soja resistente a insetos e tolerante ao glifosato de amônio MON87701 x MON 89788, o do milho MON89034 x NK603, resistente a insetos e tolerante ao glifosato, ambos desenvolvidos pela Monsanto do Brasil Ltda, e do milho Bt11 x MIR162 x GA21 desenvolvido pela Syngenta Seeds Ltda.

### **1.3 – Soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato**

Uma típica construção genética (inserto) de um OGM é constituída por pelo menos três elementos genéticos: (1) o promotor que funciona como regulador da transcrição do inserto/gene alterado; (2) o gene que foi inserido/alterado codificador para determinada característica; (3) o terminador que age como sinal de parada da leitura do inserto/gene alterado. Além disso, outros elementos genéticos podem estar presentes na construção com várias funções como estabilizar o gene, funcionar como marcadores, direcionar a ação da proteína formada em determinado tecido, etc. A construção genética deve ser integrada no genoma do organismo de forma a ser transmitida às futuras gerações (MIRAGLIA et al 2004).

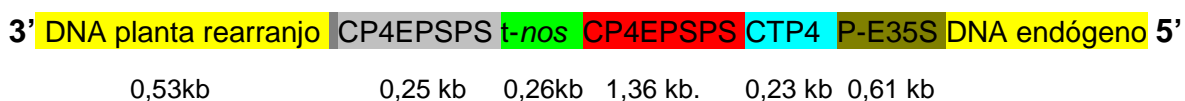
A soja Roundup Ready<sup>®</sup> foi desenvolvida pela empresa Monsanto Co. à partir da transformação do cultivar de *Glycine max* (L.) Merr. A5403 originando a linhagem 40-3-2 que possui um (1) inserto funcional que codifica a produção da enzima CP4 EPSPS (5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato sintase) de 46 KDa, que confere tolerância ao glifosato, princípio ativo do herbicida Roundup<sup>®</sup>, sendo expressa em todos os órgãos da planta. No cultivo desta soja, também conhecida como GTS, Roundup Ready<sup>®</sup> ou soja RR, o herbicida glifosato pode ser utilizado durante todo o ciclo de vida

da planta e também na fase pós-emergência das plantas infestantes (PADGETTE et al., 1995).

O glifosato (N-phosphonomethyl glycine) age como um inibidor da enzima 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (via bioquímica do chiquimato), estando presente em todas as plantas, bactérias e fungos, porém não em animais. A inibição dessa enzima resulta em supressão do crescimento e morte da planta. A enzima catalisa a transferência do radical enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) ao radical 5-hidroxil do chiquimato-3-fosfato (S3P) formando o 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato (EPSP). No cultivo convencional, o herbicida deve ser aplicado somente na preparação do solo e após a sementeira antes da emergência da planta.

Na planta geneticamente modificada, a introdução do gene de resistência codifica a produção de uma enzima semelhante (CP4EPSPS), encontrada em microrganismos, que não é inibida pelo glifosato e, portanto, preserva a via metabólica. Apesar de amplamente utilizado, a base molecular da resistência ao glifosato ainda permanece obscura. A pouca ação do glifosato na enzima CP4EPSPS pode ser primariamente atribuída ao resíduo de alanina na posição 100 do sítio ativo da enzima, que quando entra em contato com o glifosato causa uma alteração na conformação do herbicida. A substituição da alanina por glicina restitui a sensibilidade da enzima ao herbicida (FUNKE et al, 2006).

O transgene da soja RR, conforme caracterizado por Windels et al. (2001), está representado na Figura 1.



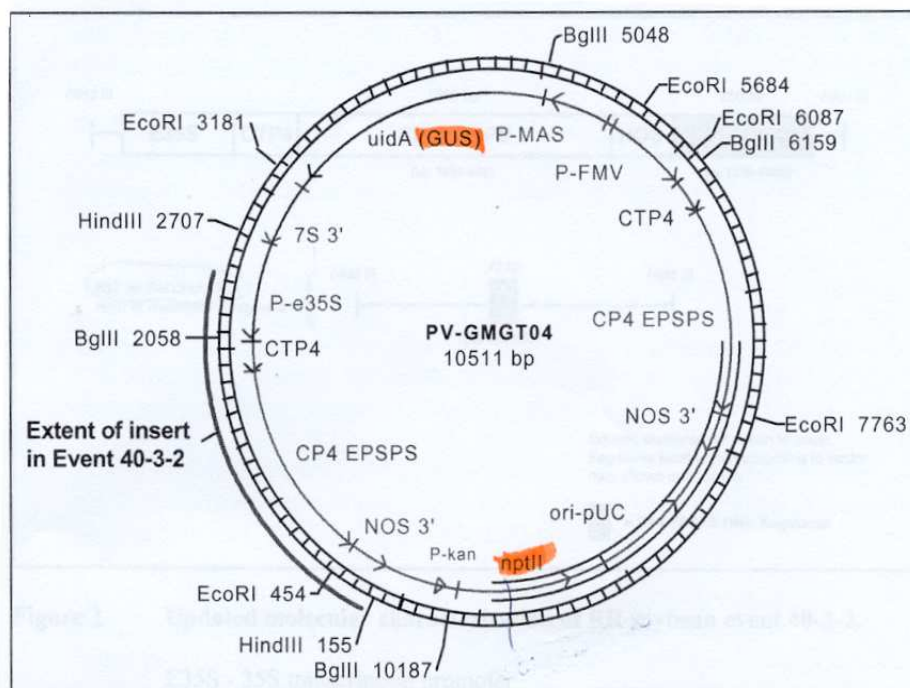
**Figura 1** - Representação esquemática do transgene na soja RR.

O gene de tolerância **CP4EPSPS** foi isolado da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4. O gene **CTP4** (peptídio trânsito ao cloroplasto), isolado da planta *Petunia hybrida*, é responsável pela condução da nova proteína EPSPS ao interior do cloroplasto onde se localiza o sítio de ação do glifosato e a via do chiquimato. O gene CP4EPSPS, ligado à sequência CTP, está sob regulação do promotor constitutivo isolado do vírus do Mosaico da Couve-flor (**P-CaMV 35S**) ativo

em todos os tecidos da planta, e do terminador do gene da nopalina sintase (**t-nos**) também de *A. tumefaciens*.

A sequência de 250 bases, adjacente ao terminador t-nos, contém parte da sequência codificante da proteína CP4EPSPS, mas não é transcrita, pois não possui promotor ou terminador da transcrição e não foi evidenciado mRNA de peso molecular correspondente nas análises de Northern blotting. Também foi caracterizada uma sequência de 72 bases correspondente a um segmento da sequência codificante da proteína CP4EPSPS que também não possui promotor e terminador da transcrição. Análises por Northern Blot e Western Blot combinadas com sequenciamento não revelaram a expressão de novas proteínas por esses segmentos de DNA (MONSANTO Co, 2000). A sequência de 534 bases na região da terminação 3' corresponde a rearranjos de DNA da soja ocorridos por ocasião na integração do inserto na planta, não correspondendo a um novo inserto (WINDELS et al. 2001).

O DNA exógeno foi inserido no tecido meristemático da soja através do método de transformação de plantas por aceleração ou bombardeamento de partículas (biobalística) utilizando um plasmídeo de *E. coli* como vetor (PV-GMGTO4) que contém duas cópias do transgene EPSPS, o gene marcador codificando para produção de  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) que foi utilizado como evidência inicial da transformação e o gene de resistência à canamicina (*npt II*) (Figura 2). O transformante original selecionado apresenta dois sítios de inserção, um com o gene de tolerância ao glifosato e outro com o gene marcador. Esses dois sítios são segregados independentemente nas gerações subsequentes sendo que a linhagem 40-3-2 apresenta somente uma cópia de um único sítio de inserção contendo o gene de tolerância ao glifosato (PADGETTE, et al, 1995).



**Figura 2** – Mapa do plasmídio PV-GMGT04 utilizado na transformação da soja RR<sup>®</sup> (Monsanto Co., 2000).

#### 1.4 – A segurança da soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato

A descoberta da abrangência do uso da recombinação gênica, trouxe grande preocupação à comunidade científica internacional pelo risco potencial da criação de microrganismos recombinantes (principalmente vírus) que poderiam produzir efeitos danosos incontroláveis à saúde pública. Esta situação forçou a elaboração de diretrizes para contenção física e biológica dos experimentos envolvendo a manipulação genética como forma de prevenir a liberação acidental de microrganismos. Documentos elaborados pelas comissões do *Codex Alimentarius* e o Protocolo de Cartagena estabeleceram as diretrizes iniciais para conduções de avaliação de segurança de alimentos geneticamente modificados e de avaliação de segurança ambiental, respectivamente (CARTAGENA PROTOCOL ON BIOSAFETY, 2000; CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

Essas diretrizes levaram à elaboração de procedimentos de avaliação de segurança para consumo humano e de avaliação do impacto ambiental, antes da comercialização, de todos os organismos geneticamente modificados e de alimentos contendo organismos geneticamente modificados baseado no fato de serem novos e não possuírem histórico de segurança alimentar ou ambiental. No caso específico da

avaliação da segurança de alimentos para consumo humano, essas diretrizes incluem o risco potencial da transferência de genes das plantas modificadas para a microflora intestinal e células dos mamíferos; a segurança dos genes marcadores de resistência a antibióticos e a avaliação de potencial alergenicidade das plantas geneticamente modificadas. No meio ambiente, dois aspectos importantes são a transferência de genes para plantas não geneticamente modificadas e o possível surgimento de insetos e ervas daninhas resistentes aos agrotóxicos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a segurança dos diversos OGMs deve ser avaliada caso a caso e uma abordagem comparativa, enfocando as similaridades e diferenças entre o alimento modificado e o convencional, a chamada equivalência substancial, auxilia na identificação de possíveis riscos e das características nutricionais e deve ser o ponto de partida para avaliação de segurança dos alimentos geneticamente modificados, seguida por testes de toxicidade, alergenicidade e transferência de genes de resistência à microbiota humana (FAO/WHO, 2000).

Em 2005, a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005) considerava que todos os alimentos geneticamente modificados colocados no mercado internacional não representavam riscos para a saúde humana diferentes dos riscos dos alimentos convencionais e que as diretrizes especificadas pelo *Codex Alimentarius* (2003) para avaliação de segurança desses alimentos eram totalmente adequadas.

Vários estudos de avaliação de segurança de vegetais geneticamente modificados como milho, batata, arroz, soja e tomate, realizados através ingestão oral em ratos e camundongos por prolongados períodos, não indicaram efeitos clínicos ou anormalidades histopatológicas significativas em órgãos e tecidos desses animais. Em relação à avaliação nutricional, experiências em grupos de ratos alimentados com soja modificada e soja convencional mostraram que o ganho de peso entre os grupos de animais foi similar (SAFETY, 2008).

Alguns estudos realizados em animais alimentados com soja tolerante ao glifosato apontaram certas alterações quantitativas em constituintes de células pancreáticas de camundongos (MALATESTA et al., 2003); alterações no núcleo de hepatócitos (MALATESTA et al., 2002) e alterações nas características de células de testículos desses animais (VECCHIO et al., 2004), associados possivelmente aos resíduos de glifosato existentes na soja. Estes autores sugeriram uma possível correlação entre a ingestão de soja geneticamente modificada e o aparecimento dessas alterações sem, no entanto, estabelecer os supostos mecanismos responsáveis por essas alterações. Entretanto, a relevância toxicológica desses



resultados foi considerada pouco clara, tendo em vista que alguns parâmetros normalmente relacionados à toxicidade nesses órgãos não foram utilizados e as informações sobre a variabilidade natural dos ensaios não foram suficientes para correlacionar o achado clínico aos efeitos tóxicos (SAFETY, 2008).

O consumo de organismos geneticamente modificados pode, portanto, envolver riscos potenciais à saúde humana e ao ambiente uma vez que muitos genes usados na produção de um alimento geneticamente modificado não seriam encontrados na cadeia alimentar e ainda a introdução desses genes poderia causar mudanças na herança genética das culturas. Por isso, os possíveis efeitos do consumo de novos alimentos geneticamente modificados na saúde humana devem ser avaliados antes da comercialização e o monitoramento, a longo prazo, deve ser realizado a fim de confirmar as avaliações nutricionais e de alergenicidade feitas na fase de pré-comercialização e possibilitar a detecção antecipada de outros possíveis efeitos adversos.

## **1.5 – Legislação brasileira de OGM**

Até 2005, o arcabouço legal que regulamentava a pesquisa e o uso comercial de organismos geneticamente modificados no Brasil era extremamente complexo não somente pela incerteza jurídica causada pela Lei de Biossegurança que vigorou entre 1995 e 2005, mas pelo seu entrelaçamento com outras legislações, notadamente a lei de agrotóxicos e a lei ambiental criando um sistema de licenciamento controlado, dependendo do caso, por até quatro instâncias reguladoras – a CTNBio, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A nova Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105 de 25/03/05) dispôs que a CTNBio é a instância multidisciplinar de caráter consultivo e deliberativo para o estabelecimento de normas de segurança e de pareceres técnicos referentes à autorização para atividades que envolvam pesquisa e uso comercial de OGM com base nas avaliações de risco zoofitossanitário, à saúde humana e ao meio ambiente. A nova lei também criou o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) que tem como atribuições principais decidir, em última e definitiva instância, nos casos de divergência entre a decisão técnica da CTNBio, sobre a liberação comercial de OGM e derivados, e os órgãos de registro e fiscalização, e também de analisar os pedidos de liberação

comercial quanto aos aspectos de conveniência e oportunidade socioeconômicas e do interesse nacional.

A CTNBio é portanto, a instância colegiada multidisciplinar, criada através da lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, cuja finalidade é prestar apoio técnico consultivo e assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a OGM, bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados.

A aceitação das plantas geneticamente modificadas no comércio mundial tem ocorrido sob grande controvérsia. Ainda que tenham sido adotados há mais de uma década e usadas em larga escala nos Estados Unidos da América, no Canadá e na Argentina, a aceitação dessas sementes tem sido mais limitada na Europa e em outros países importadores de grãos. Além disso, a presença de contaminação acidental e de pequenas quantidades de grãos geneticamente modificados em grãos e produtos alimentícios não geneticamente modificados tem sido uma grande preocupação nos países signatários do Protocolo de Cartagena de Biossegurança que estabeleceu que os organismos vivos geneticamente modificados têm que ser transportados, manuseados, utilizados e liberados de maneira a minimizar os riscos à saúde humana e ao meio ambiente (DEMEKE & JENKINS, 2009).

Muitos países têm adotado regulamentos específicos para comercialização, rastreabilidade da cadeia produtiva e rotulagem de produtos alimentícios com estabelecimento de limites para informação no rótulo da presença intencional de organismos geneticamente modificados, como forma de garantir ao consumidor o direito de escolha. Nos países da Europa esse limite é de 0,9% (EC, 2003), 3% na Coreia do Sul (KOREA, 2000), 5% no Japão e Taiwan (JAPAN, 2000), 1% na Austrália e Nova Zelândia (*Standard A18/2000*). Nos Estados Unidos e Canadá a rotulagem é voluntária (CFS, 2006).

No Brasil, a rotulagem é obrigatória segundo o Decreto nº 4.680 que estabelece que os alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal, embalados ou a granel ou *in natura*, que contenham ou sejam produzidos a partir de OGMs, com presença acima do limite de 1% do produto, contenham a informação da natureza transgênica do produto (BRASIL, 2003d). Além disso, deve

também conter o símbolo definido pela Portaria de 2.658 do Ministério da Justiça (BRASIL, 2003c).

Os elementos técnicos essenciais para a implementação tanto da legislação de rotulagem como da rastreabilidade da cadeia produtiva compreendem a utilização de métodos de amostragem apropriados, disponibilidade de materiais de referência e de métodos analíticos que permitam a determinação exata do conteúdo de OGM nos alimentos (QUERCI et al., 2009a).

## **1.6 – Análise de Alimentos**

Um dos maiores desafios que os laboratórios enfrentam é como padronizar os procedimentos de ensaios em face ao grande número de matrizes de alimentos existentes. Todos os métodos de detecção e quantificação de OGM, principalmente os métodos de análises de sequências de DNA são altamente influenciados por vários fatores sendo os principais a amostragem, o tamanho da amostra, a matriz e o grau de processamento do alimento, os métodos de extração de DNA, a presença ou não de substâncias inibidoras presentes na matriz do alimento, o grau de dano do DNA e o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos após a extração. Para se assegurar resultados fidedignos, as análises devem ser realizadas com métodos sensíveis, robustos, precisos e validados.

Os principais produtos derivados da soja, utilizados na alimentação humana, são o óleo de soja refinado, a farinha desengordurada, a proteína de soja, a lecitina (agente emulsificante), o “leite” de soja, a carne de soja e o tofu que entram na composição de vários produtos embutidos, massas, produtos de padarias, cereais, bebidas, fórmulas infantis, chocolates, temperos, biscoitos, entre outros. Os derivados da soja também são amplamente utilizados na alimentação animal como fonte de fibras e de proteínas sendo sua principal aplicação na produção de rações para a avicultura, suinocultura e bovinocultura.

A análise de produtos alimentícios e rações para animais, contendo OGMs, é necessária tanto para verificar a adequação da rotulagem à legislação em vigor para o comércio nacional e/ou internacional de grãos e matérias primas, como também para monitoramento da utilização dessa tecnologia na produção de alimentos para uma possível detecção de eventos não autorizados e efeitos adversos que possam surgir a longo prazo. Os laboratórios envolvidos, públicos ou privados, são confrontados, frequentemente, com a necessidade de adotar, em curto prazo, novas metodologias de

análise adequadas à detecção, identificação e quantificação de novos eventos que vão sendo autorizados e lançados no mercado após as avaliações de risco ao consumo humano e ao ambiente.

Neste contexto, o desafio é desenvolver métodos de detecção de OGMs que possam minimizar a competição entre o aumento crescente do número de eventos autorizados no mundo todo e o desenvolvimento de métodos de detecção, caracterização e quantificação de eventos não autorizados. Estratégias nesse sentido devem consistir de exaustivas e acessíveis coletas de dados sobre as sequências de OGMs e outros dados disseminados mundo afora.

### **1.7 – Métodos de detecção e quantificação de OGM em alimentos**

Os métodos de análise de OGMs atualmente utilizados são baseados tanto na detecção da nova proteína resultante da modificação genética introduzida como na análise das sequências de DNA.

O ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tem sido bastante utilizado na detecção e quantificação de proteínas específicas em produtos *in natura* como grãos e em produtos obtidos por processamento mecânico como farinhas. Esse método é limitado à presença da proteína na sua estrutura secundária bem como não é capaz de distinguir entre diferentes eventos que produzam a mesma proteína. Além disso, somente as análises em amostras nas quais a expressão da proteína pode ser relacionada com o material de referência utilizado ou seja, se a matriz da amostra for semelhante a do material de referência, são as que fornecem resultados confiáveis (MIRAGLIA et al., 2004).

Atualmente, os métodos mais difundidos de análise de DNA envolvem a amplificação de sequências específicas pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e várias revisões sobre esses métodos de detecção, identificação e quantificação têm sido publicadas (AHMED, 2002; ANKLAM et al., 2002; DEISINGH e BRADIE, 2005; ELENIS, et al., 2008; HOLSTEN-JENSEN et al, 2003; LIPP et al., 2005; MARMIROLI, et al., 2008; MICHELINI et al., 2008) que descrevem, avaliam e comparam os diferentes procedimentos analíticos de análises de OGM.

Os métodos baseados na PCR, tanto qualitativos como quantitativos, podem ser categorizados em 4 níveis de especificidade (HOLST-JENSEN et al., 2003):

1º - métodos de triagem: são os de menor especificidade e são direcionados aos elementos genéticos comuns a muitos eventos como os promotores e terminadores. São sequências de DNA que podem ocorrer naturalmente.

2º - métodos gene específicos: esses métodos são direcionados para a parte do transgene que possui o gene responsável pela característica da planta. Ex: gene que codifica a proteína cryIA em milho Bt ou o gene da proteína EPSPS em soja. Esses métodos, apesar de específicos, não informam se o evento está autorizado ou não, já que o mesmo gene pode ser utilizado em diversos eventos de transformação.

3º - métodos construção específicos: os alvos são sequências que se encontram na junção entre dois elementos genéticos do transgene. Ex: sequência compreendida entre o terminador *t-nos* e o gene que codifica a proteína EPSPS em soja. Apesar dessas sequências não existirem naturalmente, podem ocorrer resultados dúbios uma vez que a mesma construção pode ser usada em eventos de transformação diferentes (como nos milhos MON 809 e MON 810).

4º - métodos evento específicos: o alvo é a junção encontrada no sítio (*locus*) de integração entre o inserto de DNA e o genoma da planta sendo, portanto, de maior especificidade. A limitação está na incapacidade de distinguir entre um híbrido contendo dois ou mais OGMs (chamados *gene-stacked* OGM) e a mistura de espécies que originaram o híbrido.

Como somente os métodos que utilizam as regiões de junção entre o inserto e o genoma da planta podem fornecer a identificação do evento de transformação, esforços são direcionados no sentido de desenvolver e validar esses métodos principalmente para a detecção de eventos não autorizados, que vai depender fundamentalmente da disponibilidade de informações a cerca das modificações genéticas introduzidas.

O processo de integração do inserto ao genoma da planta é bastante complexo e de difícil controle possibilitando com que uma ou mais cópias da construção ou até mesmo fragmentos da construção possam ser inseridos e integrados ao genoma do organismo receptor, dependendo da estratégia da transformação (WINDELS et al, 2001). Como o uso de diferentes estratégias, podem ser desenvolvidos diferentes eventos que apresentem a mesma característica (por ex. expressão de proteína

cryIA/b que confere resistência a insetos em milhos). Isso faz com que haja necessidade de métodos de análise evento específicos para identificação e quantificação de cada evento.

Além disso, o surgimento de novos eventos de transformação com consequente desenvolvimento e plantio experimental de novas plantas GM pode ocasionar mistura não intencional, principalmente de grãos geneticamente modificados ainda não autorizados para comercialização. Métodos quantitativos para determinar os níveis de OGMs em alimentos ainda precisam ser desenvolvidos no sentido de determinar se os sistemas atuais de identidade preservada no manuseio de sementes não-OGM estão propriamente implementadas.

### **1.7.1 – PCR competitivo**

O PCR competitivo é baseado na co-amplificação do DNA alvo utilizando concentrações definidas de um DNA competidor que apresenta os mesmos sítios de ligação, na mesma reação de PCR. A quantificação é feita no ponto em que a amplificação do alvo produz sinal de intensidade equivalente a uma das concentrações do competidor, quando visualizado em gel de agarose. Tem como vantagem o fato de que qualquer variação na eficiência da amplificação dos dois alvos ou a presença de substâncias inibidoras vai afetar a amplificação dos dois alvos de forma igualitária. As desvantagens são a dificuldade de se encontrar uma proporção adequada entre o DNA alvo e o competidor, a construção e caracterização de um diferente competidor para cada alvo a ser quantificado e o fato de ser uma quantificação semiquantitativa (ANKLAM et al., 2002).

### **1.7.2 – Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (PCR em tempo real)**

A mais precisa e atualmente a mais amplamente utilizada abordagem para se identificar e quantificar um OGM é a Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (PCR em tempo real). Em contraste com as determinações que medem a quantidade de produto final, a PCR em tempo real monitora a reação durante a sua ocorrência em tempo real. A quantidade de produto sintetizado na reação de PCR é medida pela detecção do sinal fluorescente produzido como resultado da amplificação. Este sinal aumenta proporcionalmente com a quantidade de produto de PCR produzido em cada ciclo da reação. Pelo registro da emissão de sinal fluorescente em

cada ciclo, é possível monitorar a reação de PCR durante a fase exponencial e o primeiro aumento significativo da fluorescência corresponde à quantidade inicial de cópias do DNA alvo. O ciclo onde se observa um aumento significativo da emissão da fluorescência (Ct) permite correlacionar com a quantidade inicial de cópias de DNA alvo presente numa amostra (AHMED, 2002; HEID et al., 1996).

A especificidade da técnica de PCR em tempo real depende tanto do sistema químico utilizado para gerar e monitorar a reação como do instrumento usado para monitorar o sinal. Vários sistemas químicos já foram desenvolvidos sendo os mais utilizados os corantes intercalantes como o brometo de etídio, SYBR Green I; os sistemas baseados em iniciadores marcados com corantes fluorescentes como o LUX, Amplifluor e Plexor; e as sondas de hibridização TaqMan<sup>®</sup>, TaqMan Minor Groove (MGB), LNA, Molecular Beacons e Scorpions (GAŠPARIČ et al. 2010).

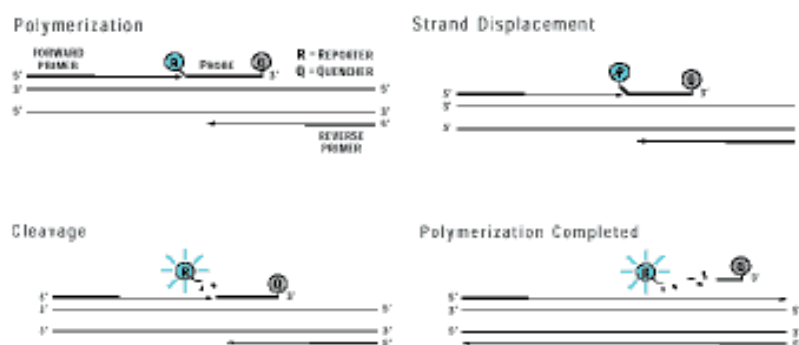
Um dos corantes intercalantes mais utilizados é o SYBR Green I que se liga inespecificamente à dupla fita de DNA, não se ligando à fita simples. Como consequência dessa ligação, a fluorescência é aumentada de 800 até 1000 vezes. À medida que a reação de PCR vai ocorrendo, o aumento da quantidade do DNA sintetizado resulta em um aumento do sinal fluorescente. A maior limitação do sistema de quantificação que utiliza o SYBR Green I 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).

O desenvolvimento de métodos automatizados baseados em compostos fluorescentes tornou possível a eliminação do processamento pós-PCR para análises dos produtos resultantes da amplificação. Nos sistemas que utilizam as sondas de hibridização, pequenos oligonucleotídeos marcados com corantes fluorescentes hibridizam dentro da região delimitada pelos iniciadores aumentando assim a especificidade da reação de PCR. O uso das sondas fluorescentes requer uma hibridização específica entre a sonda e o alvo para que ocorra a geração do sinal fluorescente. Portanto, a ocorrência de amplificação não específica devido tanto a pareamentos não específicos, como pela formação de artefatos de dímeros de iniciadores, não produz sinal fluorescente. Além disso, as sondas podem ser marcadas com diferentes corantes *reporter*, o que possibilita a detecção de mais de uma sequência amplificada numa mesma reação (reação de multiplex PCR).

Dentre as sondas de hibridização, as chamadas sondas de hidrólise ou de degradação, representadas pelo sistema TaqMan<sup>®</sup>, são as mais utilizadas na PCR em tempo real. A sonda é constituída por um oligonucleotídeo de 20 a 30 bases (com temperatura de desnaturação-T<sub>m</sub> 10°C acima da T<sub>m</sub> dos iniciadores) marcado 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 (Förster Resonance Energy Transfer ou 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 TaqDNA polimerase degrada a sonda ocorrendo liberação do corante *reporter* e emissão do sinal fluorescente. A terminação 3' da sonda é fosforilada para evitar a extensão da mesma.

A degradação da sonda da fita do DNA alvo permite a continuação da extensão do iniciador até o final. Em cada ciclo de PCR outras moléculas do *reporter* vão sendo liberadas ocorrendo assim um aumento da intensidade da fluorescência proporcional à quantidade do produto de amplificação produzido (Figura 3).



**Figura 3** - Representação da ação da TaqDNA polimerase na sonda fluorogênica durante a fase de extensão da PCR (APPLIED BIOSYSTEMS, 2003)



Os principais fluoróforos e respectivos comprimentos de onda de emissão utilizados no sistema TaqMan são o FAM (518nm), VIC (554nm), JOE (550nm, TAMRA (582nm) e ROX (610nm).

As sondas TaqMan MGBNFQ são oligonucleotídeos menores (13 a 18 bases) que possuem alta afinidade de ligação ao DNA alvo. Esse efeito é obtido através da molécula MGB (dihydrocyclopyrroloindole tripeptide – DPI3), ligada à extremidade 3' da sonda, que se ajusta a *minor groove* (sulco estreito) da dupla fita de DNA formada aumentando a estabilidade da ligação. Esta modificação causa um aumento da  $T_m$  possibilitando desenho de sondas de tamanhos menores com conseqüente aumento da especificidade da reação, principalmente nas reações de multiplex (KUTYAVIN et al, 2000). Como a molécula *quencher* (NFQ) não possui fluorescência, o ruído da reação (*background*) nos primeiros ciclos é bem menor, aumentando assim a precisão da medição da fluorescência do *reporter* ligado à extremidade 5' da sonda. Essas características induzem ao uso dessas sondas em ensaios de discriminação alélica, análises com vírus e com DNA alvo mais degradado.

As sondas LNA<sup>®</sup> (*Locked Nucleic Acid*) diferem das sondas TaqMan<sup>®</sup> por possuírem nucleotídeos com uma ponte metilênica entre a terminação 2' do oxigênio da desoxirribose com o carbono 4' (2'-O,4'-C-methylene-β-D-ribofuranosyl monomer) que produz um efeito de “fechamento” da estrutura do DNA, aumentando a estabilidade da dupla fita com aumento da  $T_m$  de 3 a 8°C (SALVI, S'ORSO e MORELLI, 2008).

As sondas “Molecular Beacons” possuem a estrutura em forma de grampo contendo na alça a sequência complementar ao DNA alvo e dois corantes nas extremidades das hastes: um corante *reporter* na extremidade 5' e o *quencher* na extremidade 3'. Com o anelamento da sonda ao DNA alvo, a estrutura em forma de grampo se desfaz eliminando o efeito quencher pelo distanciamento dos corantes.

As sondas “Scorpions” também possuem uma estrutura em forma de grampo contendo na alça uma sequência complementar ao DNA alvo, na extremidade 5' o *reporter* e na extremidade 3' o *quencher* ligado à extremidade 5' do iniciador. Durante a fase de extensão, a sequência existente na alça se anela ao DNA molde ocorrendo então o distanciamento entre os fluoróforos e o sinal fluorescente vai sendo medido pelo equipamento.

Na reação da PCR em tempo real é possível distinguir 3 fases distintas (Figura 4):

- 1ª fase: fase “lag” com flutuação correspondendo ao sinal do ruído de fundo (*background*). Nesta fase ainda não houve clivagem suficiente do corante *reporter* para que se possa detectar a fluorescência.
- 2ª fase: fase exponencial com aumento do sinal. A quantidade de produtos de amplificação dobra a cada ciclo.
- 3ª fase: formação de um platô. Não há aumento do número de produtos de amplificação.

A quantificação na reação de PCR em tempo real não ocorre no estágio final da reação (platô) e sim na fase exponencial onde há um acúmulo de produtos amplificados com conseqüente aumento da emissão de fluorescência. O ciclo onde o sinal fluorescente emitido ultrapassa o limiar de detecção de sinal permite inferir a concentração inicial do DNA alvo para cada amostra. Para isso, é necessário se estabelecer a linha *threshold* que é calculada a partir da média dos sinais fluorescentes medidos até o 15º ciclo mais 10 vezes o desvio padrão dos sinais sendo que na prática a linha *threshold* é determinada pelo operador e deve ser posicionada dentro da fase exponencial, no ponto em que as réplicas sejam mais coincidentes.

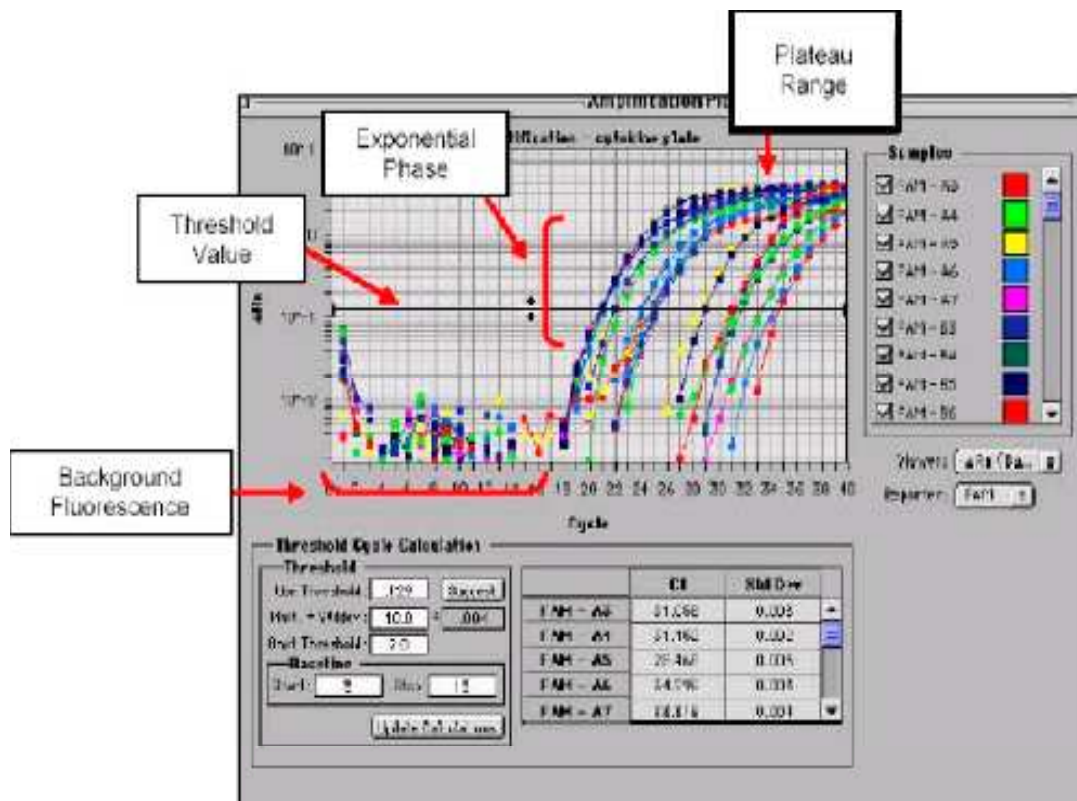
O ciclo *threshold* (Ct) é o ciclo em que a curva de amplificação de cada DNA alvo cruza a linha *threshold*. Quanto maior a quantidade inicial do alvo, mais cedo ocorre um aumento significativo da fluorescência e mais baixo será o valor de Ct.

A curva de amplificação é construída a partir do número de ciclos da reação (eixo x) e a quantidade de fluorescência normalizada ( $\Delta Rn$ ) (eixo y) que é definida e calculada pela fórmula:

$\Delta Rn = (Rn+) - (Rn-)$  – representa a quantidade de sonda fluorescente clivada durante a amplificação, normalizada pela referência passiva.

(Rn+) - é definida como a intensidade da emissão do *reporter* dividido pela intensidade de emissão da referência passiva durante o ciclo de amplificação.

(Rn-) – é definida como a intensidade de emissão do *reporter* dividido pela intensidade de emissão da referência passiva antes da amplificação.



**Figura 4** - Representação gráfica da amplificação por PCR em tempo real (WEIGHARDT, 2004)

Vários tipos de instrumentos estão disponíveis comercialmente. Eles diferem em modelos e especificações incluindo o sistema de aquecimento e resfriamento, fonte de excitação, emissão de luz, detecção de fluorescência e programas de cálculo. Por esta razão, um método quantitativo usando PCR em tempo real deve ser específico para certos tipos de instrumentos (ex: termociclador). A aplicação de um ensaio em instrumentos de diferentes plataformas requer validação para evitar erros.

Terry et al. (2002) compararam os sistemas TaqMan<sup>®</sup>, Scorpion<sup>®</sup> e SYBR Green com relação à sensibilidade e reprodutibilidade na quantificação de produtos de panificação contendo quantidades conhecidas de soja RR e verificaram que a combinação do sistema TaqMan<sup>®</sup> com a plataforma da Applied Biosystems<sup>®</sup> apresentou menor variação de Ct, apresentando resultados mais exatos e precisos. Já Andersen et al (2006) não encontraram diferenças significativas na sensibilidade da quantificação do número de cópias de soja RR entre os sistemas SYBR<sup>®</sup> Green, TaqMan<sup>®</sup>, TaqMan MGB<sup>®</sup> e Molecular Beacons. Recentemente, Gäsparič et al. (2008) compararam o sistema TaqMan<sup>®</sup> com quatro novas tecnologias de detecção: sondas

LNA<sup>®</sup> (Locked Nucleic Acid), sondas CPT (Cycling Probe Technology), Lux<sup>™</sup> (Light Upon extension) e Plexor<sup>™</sup> na quantificação de milho MON810. Todos os sistemas demonstraram características equivalentes em termos de LOD, LOQ, especificidade, repetitividade e reprodutibilidade, sendo que as sondas LNA<sup>®</sup> se mostraram como uma alternativa altamente promissora ao sistema TaqMan<sup>®</sup>, devido a certas características como a de tamanho reduzido e maior T<sub>m</sub> que aumentam a especificidade do sistema. Na revisão publicada por Gäsparič et al. (2010), na qual foram avaliados 9 sistemas químicos na detecção de milho MON810 e de soja RR, todos os sistemas demonstraram valores similares de LOD com variações nos LOQ (maiores valores com os sistemas Amplifluor, CPT e LUX), menor robustez com SYBR Green e Molecular Beacons, amplificação não específica com Plexor e semelhante desempenho dos sistemas TaqMan, LNA e TaqMan MGB.

### **1.8 - Quantificação relativa de OGM por PCR em tempo real**

A legislação atual brasileira define um OGM como sendo um organismo cujo material genético tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética. O Decreto nº 4.680 estabelece que o rótulo dos alimentos e ingredientes alimentares que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM, com presença acima de 1% do produto, apresente a informação da natureza transgênica do produto (BRASIL, 2003a).

Ingrediente alimentar é definido como toda substância, incluindo aditivos alimentares, usados na manufatura ou preparo de um produto alimentício e ainda presente no produto acabado, na forma original ou modificada. Portanto, o ingrediente é a parte do organismo (planta) diretamente empregado ou transformado posteriormente (BRASIL, 2004).

Um das questões cruciais apontadas por vários pesquisadores no desenvolvimento de métodos para a implementação da legislação é o real significado dos limites (1% no caso do Brasil) de ingredientes transgênicos em termos de genes ou como interpretar a definição de ingredientes no nível molecular (WEIGHARDT, 2006).

Uma vez que a legislação não esclarece em que base deve ser feita a interpretação do percentual do conteúdo do OGM, este pode corresponder ao peso do ingrediente modificado em função do peso total do ingrediente.

O estabelecimento do conteúdo relativo de um OGM em um produto com base na razão peso/peso do ingrediente implica na suposição de que existe uma

proporcionalidade direta entre o peso do ingrediente e o número total de genes/genoma contido nele. Entretanto, tal proporcionalidade não existe devido principalmente, à flutuação do valor de 1C entre as variedades e à incerteza na correlação entre o peso do ingrediente e o peso do DNA. Portanto, a real dosagem molecular das sequências geneticamente modificadas *versus* ingrediente analisado pode variar muito, principalmente em função da ploidia, se o evento é homozigoto ou heterozigoto e do número de inserções do genoma (WEIGHARDT, 2006).

Além desses fatores de variação, ainda deve ser considerado que os grãos GM e os não-GM, que compõe o alimento, podem possuir diferentes tamanhos de células devido a diferenças no conteúdo relativo de água que varia em função das formas de cultivo, colheita e secagem dos grãos ou que o conteúdo de DNA/célula difere devido a diferenças genéticas, o que pode criar uma considerável lacuna entre a unidade legal de medida (peso) e a unidade analítica de medida (número de cópias de DNA) (HOLSTEN-JENSEN e BERDAL, 2004).

Na quantificação por PCR em tempo real, o conteúdo de OGM em uma amostra é expresso como a quantidade de material geneticamente modificado em relação à quantidade de um gene ou de uma sequência endógena. Esta deve ser escolhida de modo a ser espécie específica; estar presente em uma única cópia por genoma haplóide; estar presente, de forma estável, nas diversas linhagens de uma espécie de planta, e ser amplificada com a mesma eficiência do que o gene geneticamente modificado.

No caso de alimentos processados e constituídos por vários ingredientes outros fatores vão influenciar ainda mais na interpretação dos resultados das análises quantitativas. Nos alimentos que contenham diferentes componentes derivados da mesma espécie, tais como farinha de soja e lecitina, os métodos baseados na análise do DNA não são capazes de distingui-los e eles serão dosados como um único ingrediente, o que pode acarretar numa menor ou maior estimativa do conteúdo do OGM na amostra (WEIGHARDT, 2007). Além disso, nem os métodos evento específicos possibilitam a distinção entre uma mistura de dois eventos individuais e a presença do híbrido contendo dois mais ou mais OGMs.

De fato, a quantificação do conteúdo geneticamente modificado em uma amostra não fornece a real dosagem molecular das modificações (número de genomas haplóides modificados *versus* número total de genomas haplóides) nem o conteúdo definido baseado nos regulamentos atuais (tanto o europeu como o brasileiro), ao

invés disso, fornece uma dosagem relativa do gene determinada em relação ao material de referência empregado.

O teor de material geneticamente modificado é quantificado e expresso pela relação entre o número de cópias do DNA geneticamente modificado e o número de cópias do DNA endógeno, específico da espécie, calculado em termos de genoma haplóide. Portanto, a análise de quantificação de OGM por PCR em tempo real deve incluir os dois sistemas:

- um sistema para detecção de sequência específica do alvo do DNA geneticamente modificado;
- um outro sistema para detecção da sequência do gene endógeno a ser usado como referência no cálculo da quantidade relativa do material geneticamente modificado.

A quantificação do teor de OGM numa amostra pode ser feita através da quantificação do número de cópias de cada alvo separadamente ou pelo método  $\Delta Ct$ , calculado pela diferença entre os Cts dos dois alvos.

Na quantificação do número de cópias são preparadas duas curvas separadamente através de diluições seriadas do material de referência levando em consideração a eficiência de amplificação dos diferentes alvos. Quando ocorrem diferenças entre as eficiências da amplificação pode haver uma subestimativa ou superestimativa do conteúdo de OGM da amostra (CANKAR et al., 2006).

As quantidades do gene endógeno e do gene GM são determinadas por interpolação com as respectivas curvas analíticas. O conteúdo do OGM (percentual) é calculado pela razão entre a quantidade do alvo geneticamente modificado e a quantidade do alvo endógeno, conforme a fórmula:

$$\% \text{ OGM} = \frac{\text{alvo GM}}{\text{endógeno}} \times 100$$

No método  $\Delta Ct$ , a curva analítica é construída utilizando-se uma série de pontos correspondentes às diferentes concentrações conhecidas dos materiais de referência certificados (MRC). No caso do MRC de soja geneticamente modificada essa faixa vai de 0% a 5%. A curva é construída com os valores de  $\Delta Ct$  sendo:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene geneticamente modificado} - Ct \text{ gene endógeno}$$

O conteúdo do OGM na amostra é determinado por interpolação do valor do  $\Delta Ct$  da amostra na curva analítica formada com as diversas concentrações do material de referência, sendo os resultados expressos em termos percentuais do OGM presente na amostra.

### **1.8.1 – Quantificação de soja RR em alimentos**

Vários sistemas de quantificação por PCR em tempo real têm sido descritos para quantificação de soja RR utilizando vários elementos genéticos como alvo, como por ex. o promotor 35S (ALARY et al., 2002, ISO nº 2150, 2005), terminador-*nos* (CORBISIER et al., 2005; PERMINGEAT et al., 2002), CP4EPSPS (PAÜLI, LINIGER e SCHROTT, 2001; VAÏTILINGOM et al, 1999), sequências presentes na construção do evento (FOTI et al., 2006; HIRD et al., 2003; ISO nº 21570, 2005; KURIBARA et al., 2002; Report of the EU tender, 2001; SHINDO et al., 2002), sequências do sítio de integração entre o inserto e o genoma da planta (BERDAL e HOLSTEN-JENSEN, 2001; HUANG e PAN 2005; JRC, 2009; TAVENIERS et al., 2001; TERRY e HARRIS, 2001).

Desses métodos citados, alguns já foram submetidos a ensaios interlaboratoriais de acordo com os protocolos internacionais padronizados, como última etapa da validação do método de análise: os métodos construção específicos estudados por Hird et al. (2003) na matriz farinha de soja; pelo BgVV (Report of the EU tender, 2001) na matriz farinha de soja e proteína texturizada de soja; por Shindo et al. (2002) em sementes de soja; o método gene específico estudado por Paüli, Liniger e Schrott (2001) em farinha de soja e o método evento específico publicado pelo JRC (2009) para grãos e sementes de soja. Os resultados dos estudos colaborativos para validação desses métodos e de outros métodos para detecção e quantificação de eventos de soja, milho, tomate, batata, canola, arroz, algodão e beterraba estão publicados no banco de dados do JRC (BONFINI, 2009). Neste banco de dados já estão incluídas a soja LL evento A2704/12 e a soja LL evento A 5547-127, aprovados recentemente no Brasil.

Windels et al. (2001) isolaram, usando a técnica de AFLP (Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Amplificados) com adaptadores, ambas as regiões adjacentes às terminações do inserto do DNA de soja RR evento 40-3-2 e parte do sítio de integração. Uma vez que o fragmento de integração foi isolado e re-amplificado, sua sequência pode ser determinada. A sequência de bases relativa à junção do promotor-35S / genoma da planta está descrita no banco de dados EMBL

acesso AJ 308514 e a sequência da junção 3'-*tnos* / genoma da planta no EMBL acesso AJ 3085515. Por esse trabalho foi demonstrado que na terminação 5' (promotor 35S) não ocorreram importantes rearranjos durante a integração do inserto na planta o que favorece o uso dessa região como alvo das reações de PCR. Já na terminação 3' (*t-nos*) foram encontradas sequências correspondentes a rearranjos durante a integração do inserto. A partir da publicação dessas sequências foram sendo desenvolvidos os métodos de quantificação evento específicos.

Taverniers et al. (2001) desenvolveram e validaram conjuntos de iniciadores e sondas usando o sítio de integração entre o promotor 35S e o genoma de soja como alvo, utilizando o sistema Light-cycler<sup>®</sup> com duas sondas FRET para cada alvo. Foram produzidos calibradores externos tanto para a quantificação do gene endógeno (lectina) como para a junção do promotor 35S ao genoma da planta e quantificadas várias amostras de alimentos com concentrações conhecidas de OGM para testar o método.

Terry e Harris (2001) também desenvolveram dois métodos de quantificação evento específico de soja RR tendo como alvo o sítio de integração entre o promotor 35S e o genoma da planta, comparando os sistemas TaqMan<sup>®</sup> e Scorpion<sup>®</sup> quanto à sensibilidade, linearidade das curvas de calibração, reprodutibilidade e exatidão dos resultados.

Berdal e Holst-Jensen (2001) utilizaram como alvo o sítio de inserção 3' *t-nos* / genoma da planta para quantificação de soja RR no sistema TaqMan<sup>®</sup>.

Burns et al. (2006), na comparação de calibradores constituídos por DNA de plasmídeos e DNA genômico, utilizaram um método evento específico (sítio de inserção 5' p35S / genoma da planta).

Andersen et al. (2006) na avaliação da eficiência de alguns sistemas químicos de quantificação por PCR em tempo real utilizaram também um método evento específico do sítio de inserção *t-nos* / genoma da planta.

O JRC (2009) validou o método evento específico (sítio de inserção 5' p35S / genoma da planta), desenvolvido pela "Monsanto Company", para quantificação de soja RR a partir de grãos e sementes.

Alguns métodos utilizam kits disponíveis no comércio para quantificação de soja geneticamente modificada por PCR em tempo real. Podem ser citados o "TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit, produzido pela Applied Biosystems, cujo alvo é o promotor 35S (método de triagem) usando o sistema TaqMan, o "Light cycler GMO soy



quantification kit”, produzido pela BioteCon Diagnostics GmbH, cujo alvo é a região entre o promotor 35S e o gene CTP e utiliza o sistema Light Cycler.

A confiabilidade da análise quantitativa depende de vários fatores entre eles os relativos às propriedades inerentes da amostra, à homogeneização, ao método de extração e à eficiência da reação de PCR em Tempo Real (CANKAR et al., 2006).

A degradação do DNA provocada pelos diferentes etapas do processamento dos alimentos é um dos obstáculos à quantificação precisa dos alimentos pelo fato de que o grau de degradação do DNA recombinante pode ser diferente da degradação do gene endógeno, como também a degradação pode resultar em fragmentos de DNA menores do que o tamanho necessário para a amplificação (VAN DUIJIN et al., 2002; WEIGARDT, 2007). Além disso, a presença de substâncias inibidoras também influencia em muito na eficiência da amplificação. Rott et al. (2004) e Gryson, Dewettinck e Messens (2007) após análises em uma série de produtos submetidos a vários níveis de processamento, verificaram que os métodos são fortemente influenciados pela quantidade, qualidade e presença de inibidores na solução de DNA extraída desses alimentos.

Nas análises de quantificação de OGMs em alimentos processados, outro fator crítico na interpretação dos dados é o material de referência utilizado na curva de calibração. Os mais comumente utilizados são os materiais de referência certificados (MRC) produzidos pelo “Institute for Reference Materials and Measurements” (IRMM, Belgium) a partir da moagem, homogeneização e mistura de grãos geneticamente modificados com os grãos não modificados. O uso dos MRCs é limitado ao baixo número de eventos disponíveis, à faixa de concentração (0-5%) e à composição molecular já que as sementes utilizadas na produção podem apresentar diferentes níveis de ploidia. Quando não há disponibilidade dos materiais certificados são utilizados materiais obtidos da extração de DNA de sementes, folhas ou grãos 100% geneticamente modificados.

Como a quantificação de OGM está baseada em curvas analíticas, a similaridade da eficiência da reação de PCR da amostra e do material de referência é um pré-requisito para uma quantificação exata. Porém, similaridade entre a eficiência das reações pode não ocorrer principalmente na quantificação de alimentos de matrizes diferentes da matriz do MRC. Por isso, trabalhos vêm sendo realizados para desenvolver fragmentos de DNA clonados em plasmídios (BURNS et al., 2006; CHARELS et al., 2007; HUANG e PAN, 2005; KURIBARA et al., 2002; MATTARUCCHI et al., 2005; SHINDO et al., 2002; TAVENIERS et al., 2001;

YOSHIMURA et al., 2005) que seriam mais apropriados para quantificação de qualquer tipo de matriz, incluindo amostras compostas, além de poderem ser utilizados em faixas mais amplas do número de cópias alvo (ZĚL et al., 2008). Essas sequências também são mais apropriadas na determinação dos limites de detecção e de quantificação (LOD e LOQ) nas amostras em análise.

### **1.8.2 – Detecção de OGM em alimentos no Brasil**

No Brasil, poucos trabalhos já foram publicados com avaliações da presença e percentual de OGMs em alimentos comercializados. Cardarelli et al. (2005) analisaram 78 amostras de alimentos e demonstraram a presença de soja RR em vários tipos de alimentos processados como leite de soja, massas, salsichas, sopas desidratadas, em grãos de soja e em ração animal. Marcelino, Guimarães e Barros (2007) realizaram um extenso estudo de detecção e quantificação de alimentos geneticamente modificados no período entre 2000 e 2005 encontrando 46,1% das amostras acima de 1%; Brod et al. (2007) analisaram 37 amostras de produtos contendo soja e encontraram 4 amostras de farinha de soja e 15 de leite de soja positivas para a presença de soja RR. Brod e Arisi (2008) analisando 62 amostras de proteína texturizada de soja e “leite” de soja em pó encontraram somente 2 de 40 amostras contendo mais 1% de soja RR. Greiner e Konietzny (2008) publicaram dados de 100 produtos alimentícios contendo soja e 100 contendo milho que foram analisadas no período entre 2000 a 2005. Eles encontraram de 11% a 36% de amostras contendo mais do que 1% de soja RR e de 4% a 6% contendo mais do que 1% de milho GM. Ferreira, Branquinho e Cardarelli-Leite (2009) encontraram teores maiores do que 1% de soja RR em 75% das amostras de farinha de trigo e em 100% de preparados à base de farinha de trigo. Por outro lado, nenhum milho MON810 foi encontrado nas 81 amostras analisadas por Dinon et al (2008). Nenhuma amostra com teor de OGM acima de 1% estava rotulada com os dizeres “contem transgênico” como determina a legislação de rotulagem. Esses dados reforçam a necessidade de contínua investigação da presença e quantificação de OGMs presentes em alimentos processados.

Um dos maiores desafios dos órgãos reguladores em todo mundo é o de associar o direito do consumidor às informações confiáveis a cerca dos alimentos comercializados com a necessidade de fornecimento de alimentos seguros tendo em vista as limitações técnicas de detecção, identificação e quantificação de qualquer

variedade geneticamente modificada aprovada ou não, na imensa diversidade de matrizes existentes.

O avanço da pesquisa e desenvolvimento de novos alimentos geneticamente modificados vai demandar, dos órgãos reguladores brasileiros, entre eles o INCQS, um conhecimento cada vez maior de metodologias para controle desses produtos para verificar o cumprimento da legislação de rotulagem como também para o monitoramento do uso desses produtos a fim de prever o aparecimento de possíveis efeitos adversos.

### **1.9 – Desafios e tendências na análise de OGM**

A tradicional estratégia da análise de OGM consiste, primeiramente, na realização de ensaios presuntivos visando a detecção dos elementos genéticos mais comumente utilizados nas construções (p35S e t-nos) seguido da identificação do evento por meio de ensaios construção específicos ou evento específicos e por fim a quantificação do OGM. Esta estratégia, entretanto, já encontra limitações devido ao constante aumento do número de eventos e à diversidade das novas construções e complexidade dos novos eventos (várias características no mesmo evento) que vem sendo desenvolvidos e lançados no mercado. Portanto, novas abordagens vêm sendo apresentadas incluindo novas estratégias para a seleção do elemento genético a ser investigado, o uso de métodos de alta eficiência para detecção de múltiplos alvos e uso de modelos matemáticos e algoritmos que permitam a conversão de resultados analíticos em indicação da presença de potenciais OGMs numa amostra desconhecida (QUERCI et al., 2010 ).

A chamada plataforma CoSYPS (“Combinatory SYBR<sup>®</sup> Green real-time PCR Screening”), desenvolvida pelo “Scientific Institute of Public Health” (IPH, Bélgica), se baseia, em linhas gerais, numa matriz com os dados referentes aos principais elementos genéticos possíveis de serem utilizados na construção das diversas plantas geneticamente modificadas. Esta matriz, aliada a PCR pelo sistema SYBR<sup>®</sup> Green, forma a base para a decisão de qual evento pode estar presente numa amostra (QUERCI et al., 2010).

Outro sistema que foi desenvolvido para a detecção de múltiplos eventos é o “Real Time PCR based Ready-to-use Multitarget Analytical System” (QUERCI et al., 2009) e consiste na análise de somente uma placa de 96 orifícios contendo iniciadores e sondas liofilizados para detecção individual e identificação simultânea de 39 eventos

em 7 espécies de plantas. Esses iniciadores e sondas são os utilizados nos métodos já validados pelo JRC.

Assim como os sistemas desenvolvidos para detecção de múltiplos eventos numa só corrida de PCR em tempo real, outras metodologias já vêm sendo utilizadas para a multidetecção, como a dos microarranjos de DNA que consistem de sondas específicas imobilizadas em suporte de vidro. Vários microarranjos já foram desenvolvidos para a detecção simultânea de eventos de milho, soja, genes endógenos e elementos genéticos comuns (ELENIS et al., 2008). Dentre esses sistemas de microarranjos, o Dual<sup>®</sup> Chip GMO PCR, já validado pelo CRL/JRC, permite a identificação dos elementos genéticos p35S, *t-nos*, *pat*, *cry1A(b)-1*, *cry1A(b)-2*, *cry1A(b)-3/cry1A(c)*, EPSPS-1, EPSPS-2 e *p-nos-nptII*, os genes endógenos invertase (milho), cruciferina (canola), lectina (soja) e *rbc1*, um gene universal para plantas, e uma sonda específica para CaMV para controle da contaminação das plantas por esse vírus. Esse sistema permite a identificação de todos os eventos que tenham na sua estrutura o gene *cry1A(b)* e EPSPS (HAMELS et al., 2009).

O uso dessas tecnologias, combinado ao estabelecimento de bases de dados contendo todas as modificações encontradas nos eventos autorizados e não autorizados já disponíveis e a modelos matemáticos desenvolvidos para análise dos resultados, permitiram a detecção, nos países europeus, de eventos não autorizados de arroz e de milho (MICHELINI et al., 2008).

### **1.10 – Justificativa e relevância do trabalho**

A escolha da soja RR como modelo para este trabalho foi feita considerando-se que este foi o primeiro evento permitido pela legislação brasileira para uso em alimentação humana e animal; que a sua construção genética já está bem caracterizada; e que já existe um razoável número de publicações a respeito de testes de detecção e quantificação.

Atualmente, a quantificação de OGM de soja está relativamente limitada ao uso de kits de quantificação disponíveis no mercado sendo um dos mais utilizados, o que tem como sequência alvo o promotor 35S (método de triagem). A quantificação de soja RR em matrizes complexas que possam conter esse elemento genético oriundo de outros vegetais geneticamente modificados pode resultar em falsos positivos ou em níveis superestimados de OGM nesses alimentos. O desenvolvimento de métodos evento específicos visa a quantificação dessas matrizes com maior confiabilidade.

Além disso, o futuro plantio dos eventos de sojas geneticamente modificadas tolerantes ao herbicida glifosinato de amônio, que também possuem na construção o promotor p35S, aprovadas recentemente no Brasil, vai demandar a utilização de métodos evento específicos para a diferenciação entre os três diferentes tipos de sojas geneticamente modificadas.

A técnica de PCR em Tempo Real é uma poderosa ferramenta de quantificação de OGM, mas ainda é bastante influenciada por fatores como amostragem, eficiência da extração do DNA, presença de substâncias inibidoras da reação de PCR oriundas tanto dos reativos da extração como da própria matriz do alimento, pelo nível de degradação do DNA ocasionado pelos diferentes processamentos na manufatura do alimento e pelo próprio genoma vegetal. O estudo da quantificação de alimentos complexos com métodos que usam sequências distintas pode contribuir com respostas a algumas dessas questões.

Uma vez que essa tecnologia seja de domínio no INCQS, abrem-se amplas possibilidades para o uso dessa técnica nas áreas de desenvolvimento de kits para quantificação evento específico de soja RR de custo mais acessível aos laboratórios de controle de qualidade e de desenvolvimento, a curto prazo, de métodos de identificação e quantitativos de outros eventos que já estão sendo autorizados para comercialização no Brasil.

Há necessidade de conhecimento da realidade brasileira quanto ao percentual de soja geneticamente modificada presente nos alimentos uma vez que já foram detectados OGMs de soja e de milho em alimentos comercializados em vários Estados sendo que muitas amostras apresentaram percentuais acima de 1% sem constar nenhuma informação no rótulo.

Em função da sua missão institucional, o INCQS tem atuado de forma participativa na organização de uma estrutura de Vigilância Sanitária que permita identificar, avaliar e gerenciar riscos à saúde humana. Isto se tornou um grande desafio em função da complexidade dos avanços tecnológicos, principalmente na área de alimentos, o que pode vir a ocasionar situações de risco, de ação e controle muitas vezes ainda desconhecidos. Por esta razão há uma necessidade evidente de desenvolvimento e implantação de metodologias de ponta como as de quantificação de organismos geneticamente modificados em produtos alimentícios.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo geral**

Estudo de métodos de quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos pela Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (Real Time PCR), utilizando diferentes regiões do genoma, com desenvolvimento de método de quantificação evento específico.

### **2.2 - Objetivos específicos**

- 1) Avaliar o efeito de 02 protocolos de extração de DNA na quantificação pela PCR em Tempo Real.
- 2) Avaliar alguns indicadores de desempenho: exatidão, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método que tem como alvo a região do promotor 35S (método de triagem) utilizando o “TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit”.
- 3) Determinar o conteúdo de OGM em alimentos processados utilizando o método de triagem e avaliar a rotulagem em função da legislação brasileira.
- 4) Desenvolver um método de quantificação de soja RR cujo alvo seja a região de integração do promotor 35S e o genoma da planta (quantificação evento específico) utilizando o sistema TaqMan<sup>®</sup>.
- 5) Avaliar alguns indicadores de desempenho do método desenvolvido: especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão.
- 6) Avaliar o conteúdo de OGM em 02 matrizes de alimentos utilizando o método evento específico desenvolvido.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 – Origem dos DNA e amostras utilizados nos estudos dos métodos**

##### **3.1.1 - Materiais de Referência Certificados (MRC)**

Foram utilizados os seguintes materiais de referência certificados (MRC) produzidos pelo “Institute for Reference Materials and Measurements” – JRC-IRMM - (Bélgica) e comercializados pela Sigma-Aldrich:

- IRMM 410S e ERM BF 410 compostos por soja em pó contendo várias concentrações (0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5%) de soja RR<sup>®</sup>.
- ERM BF 411 composto por milho em pó contendo 0% e 0,1% de milho Bt 176.
- ERM BF 413 composto por milho em pó contendo 0% e 0,1% de milho MON 810.
- ERM BF 412 composto por milho em pó contendo 0% e 0,1% de milho Bt11.
- ERM BF 414 composto por milho em pó contendo 0% e 0,1% de milho GA21.

##### **3.1.2 - Soja GM e não-GM**

- soja GM cultivar Msoy 8585 RR, produzida pela Monsanto S.A.
- soja não GM cultivar M98-1280, produzida pela Monsanto S.A
- soja não GM, produzida pela Embrapa Agro-Indústria de alimentos.

##### **3.1.3 – Feijão geneticamente modificado**

Foi extraído DNA a partir de folhas de feijão geneticamente modificado:

- evento Olathe M1-4, cedido pela Embrapa Arroz e Feijão
- evento Olathe 5.1, cedido pela Embrapa Arroz e Feijão

##### **3.1.4 – Outros vegetais utilizados no estudo da especificidade**

- Arroz branco, arroz integral, aveia, trigo, cevada, feijão, mistura de sete cereais. Essas amostras foram adquiridas no comércio da Cidade do Rio de Janeiro.

### **3.1.5 – Amostras de produtos contendo soja geneticamente modificada (GM) provenientes de testes de proficiência providos pelo “Central Science Laboratory” (GeMMA/CSL/UK)**

- Amostra de biscoito preparada na rodada nº 27 contendo 2,4% de soja RR<sup>®</sup> (valor designado).
- Amostra de mistura de farinhas preparada na rodada GeMSU04 contendo 1,48% de soja RR<sup>®</sup> (valor designado).
- Amostra de mistura de farinhas preparada na rodada GeMSU04B negativa para soja RR<sup>®</sup>.

### **3.1.6 – Amostras de alimentos analisadas para verificação da adequação da rotulagem à legislação vigente e para o estudo dos métodos de quantificação**

Foi analisado um total de 68 amostras de alimentos compreendendo 12 amostras de grãos de soja; 6 amostras de extrato de soja; 5 amostras de bebidas a base de soja com frutas; 7 amostras de fórmulas infantis; 8 amostras de proteína texturizada de soja (TPS); 3 amostras de farinha de soja; 7 amostras de farelo de soja; 2 amostras de fibra de soja; 6 amostras de sopa desidratada; 7 amostras de produtos cárneos; 4 amostras de produtos vegetais e 1 amostra de ração para animais. As amostras foram coletadas no comércio varejista e/ou indústria de alimentos, no período de 2004 a 2008, em cidades localizadas na região sul e região sudeste, pelas autoridades sanitárias como parte de programas de monitoramento.

## **3.2 - Extração de DNA**

Neste trabalho foram utilizados dois métodos de extração de DNA genômico. Um dos métodos usa como base do tampão de extração a substância brometo de cetiltrimetil amônio - método CTAB - e o outro usa o kit comercial de extração DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) que se baseia na lise celular através de tampão de lise seguida de precipitação das proteínas e polissacarídeos que são posteriormente removidos por coluna de sílica.

O método CTAB, conforme descrito por Cardarelli et al. (2005), foi utilizado na extração de DNA das amostras de alimentos e dos materiais de referência certificados (MRCs). De 50 mg dos MRCs e 100 mg das amostras de alimentos, previamente



trituras e homogêneas, foram extraídas com 1000 µL de detergente CTAB (20g CTAB/L; 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl; 20 mM EDTA, pH 8,0) e aquecidos a 65°C em banho seco durante 1h30 minutos e posteriormente centrifugados a 13000 x g por 10 minutos. 500 µL do sobrenadante foram adicionados de 200 µL de clorofórmio e após centrifugação a 13000 x g por 10 minutos o sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionado de tampão de precipitação com CTAB (5g CTAB/L; 40 mM NaCl, pH 8,0) e incubado à temperatura ambiente durante 1h30 minutos. Após centrifugação a 13000 x g por 10 minutos, o precipitado foi dissolvido em NaCl (1,2 M) e adicionado de 350 µL de clorofórmio. Após centrifugação a 13000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi tratado com igual volume de álcool isopropílico gelado e incubado por 24h a -20°C. Após esse período, foi centrifugado a 13000 x g por 10 minutos a 4°C e o sedimento foi secado à temperatura ambiente e adicionado de 100 µL de água purificada. O material foi deixado por aproximadamente 18 horas a 4°C e posteriormente ressuspenso com leve agitação.

No método CTAB, baseado no protocolo descrito em JRC (2005), há a incorporação de RNase A e proteinase K na etapa de extração com CTAB e a inclusão de uma etapa de lavagem com clorofórmio. Este método foi utilizado para extração de DNA dos grãos de arroz, arroz integral, aveia, cevada, mistura de 7 cereais, feijão em grão e folhas de feijão geneticamente modificado. 200 mg de grãos, previamente triturados e homogêneos, foram hidratados com 300 µL de água purificada e homogêneos, e extraídos com 700 µL de detergente CTAB (20g CTAB/L; 1,4M NaCl; 0,1M Tris-HCl; 20 mM EDTA, pH 8,0) adicionados de 10 µL de solução de RNase A (10 mg/mL) e aquecidos a 65°C em banho seco durante 30 minutos. Foram adicionados 10 µL de solução de proteinase K (20 mg/mL) e prolongada a incubação por mais 30 minutos, sendo o material posteriormente centrifugado a 13000 x g por 10 minutos. 500 µL do sobrenadante foram adicionados a 500 µL de clorofórmio, homogêneos em agitador de tubos por 30 segundos e após centrifugação a 13000 x g por 15 minutos o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 500 µL de clorofórmio, novamente homogêneo e centrifugado a 13000 x g por 5 minutos. A camada superior aquosa foi transferida para outro microtubo e foram adicionados duas vezes o seu volume de tampão de precipitação com CTAB (5g CTAB/L; 40 mM NaCl, pH 8,0) e incubado à temperatura ambiente durante 1 hora. Após centrifugação a 13000 x g por 5 minutos, o sedimento foi dissolvido em 350 µL de NaCl (1,2 M) e adicionado de 350 µL de clorofórmio. Após centrifugação a 13000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi tratado com 0,6 vezes o volume de álcool isopropílico gelado,

agitado em Vortex e centrifugado a 13000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 500 µL de etanol a 70% e agitado cuidadosamente. Após centrifugação a 13000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi secado à temperatura ambiente e adicionado de 100 µL de água purificada. O material foi deixado por aproximadamente 18 horas a 4°C e posteriormente ressuspensão com leve agitação.

O Método DNeasy® Plant Mini Kit foi utilizado na extração de DNA das amostras de alimentos e do MRC 5% na comparação dos métodos de extração e na extração do DNA dos grãos dos vegetais trigo, arroz integral, aveia e em folhas de feijão geneticamente modificado utilizados na avaliação da especificidade. De 50 mg do MRC e 100 mg das amostras de alimentos e dos vegetais previamente triturados e homogeneizados, foram extraídos com 400 µL de tampão AP1 e 4 µL de solução de RNase A (100 mg/mL) e aquecidos a 65°C em banho seco durante 1h. Foram adicionados 130 µL de tampão AP2, incubados em gelo por 5 minutos e centrifugados a 13000 x g por 5 minutos. O lisado foi pipetado na minicoluna QIAshredder e centrifugada a 13000 x g por 2 minutos. A fração filtrada foi transferida para tubo tipo Eppendorf e foi adicionado 1,5 x o volume de tampão AP3/E. A mistura foi colocada na coluna DNeasy mini spin e centrifugada a 6000 x g por 1 minuto. A coluna foi lavada 2 vezes com 500 µL de tampão AW contendo etanol e centrifugada a 13000 x g por 2 minutos e o DNA foi eluído com 100 µL de tampão de eluição AE.

### **3.3 – Verificação da amplificabilidade do DNA extraído dos vegetais utilizados na verificação da especificidade.**

A verificação da amplificabilidade dos DNA extraídos dos vegetais foi realizada através de reações de PCR qualitativo e os fragmentos amplificados na PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 2% (p/v) contendo 0,3 µg/mL de brometo de etídio (Promega) imerso em tampão TBE 1X (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA pH 8,4) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e registrados no analisador de imagens “ImageMaster-VDS-Pharmacia Biotech.

Os nomes dos iniciadores, os alvos específicos, o tamanho dos produtos da amplificação e as referências bibliográficas utilizadas estão citados na tabela 1.

**Tabela 1** – Iniciadores utilizados na amplificabilidade dos vegetais

<b>Vegetal</b>	<b>Nome dos iniciadores</b>	<b>Alvo</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Referência</b>
soja	GMO3 / GMO4	gene <i>le1</i>	118 pb	Meyer et al, 1996
milho	Ze01 / Ze02	gene <i>ze1</i>	329 pb	Matsuoka et al, 2000
trigo	wx 012-5' / wx 012-3'	gene <i>waxy-D1</i>	102 pb	Iida et al, 2005
trigo	univ F / univ R	gene <i>PKABA1</i>	86 pb	Ronning et al, 2006
arroz	SPS F / SPS R	gene <i>SPS</i>	81 pb	Ding, 2004
aveia	ASA1097 F / ASA1177 R	gene <i>avenina</i>	104 pb	Sandberg, 2003
cevada	univ F / univ R	gene <i>PKABA1</i>	86 pb	Ronning et al, 2006
cevada	HUM 618F / HUM 1763 R	gene <i>hordeina</i>	164 pb	Sandberg, 2003
mistura de 7 cereais	univ F / univ R	gene <i>PKABA1</i>	86 pb	Ronning et al, 2006

### 3.4 - Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (PCR em Tempo Real) utilizando o reagente “TaqMan® GMO 35S Soy Detection kit”

As amostras de alimentos contendo soja RR e os MRC utilizados na comparação dos métodos de extração, na avaliação dos parâmetros de desempenho do método e na verificação do conteúdo de OGMs foram quantificadas pela PCR em Tempo Real através da amplificação do alvo correspondente ao gene endógeno da soja – *lectin (Le 1)* e o alvo do promotor p35S em reação multiplex. O kit contém o coquetel de amplificação composto de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, o corante ROX (referência passiva), os iniciadores e sondas para ambos os alvos e a enzima *Ampli Taq Gold®* polimerase. A sonda para o alvo p35S é marcada na posição 5' com o corante fluorescente *reporter* FAM (6-carboxyfluorescein) e a sonda para o alvo endógeno é marcada com o corante fluorescente *reporter* VIC (2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein). A posição 3' de ambas as sondas é marcada com o corante fluorescente com função de *quencher* TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine). Detalhes sobre as sequências dos iniciadores e das sondas, tamanho do fragmento amplificado e concentrações dos reagentes não foram fornecidos pelo fabricante. O kit contém controles negativos e positivos (100% RR®) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001 a).

As reações foram realizadas em microplacas com 96 orifícios em um volume total de 25 µL: 22 µL do coquetel de amplificação, 0,5 µL de enzima polimerase e 2,5 µL de DNA molde, no equipamento ABI Prism® 7500 Sequence Detection System com a seguinte termociclagem: 1 ciclo a 94 °C por 9 minutos para ativação da enzima

polimerase e desnaturação do DNA seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95 C por 20 segundos e anelamento e extensão a 60 C durante 1 minuto.

Após a corrida, a linha basal foi fixada entre os ciclos 3 e 15 e a linha threshold foi posicionada manualmente dentro da fase geométrica da curva de amplificação. Os dados gerados foram analisados pelo programa “ABI Prism 7500 SDS” para determinar os valores dos Cts do corante *reporter* para ambos os alvos. A concentração relativa (percentual) de OGM foi calculada pelo programa GMO Analysis Macro<sup>®</sup> v1.7.2, desenvolvido e fornecido pela Applied Biosystems.

### **3.5 – Avaliação de dois métodos de extração de DNA**

Foram comparados os métodos de extração de DNA pelo CTAB, conforme descrito por Cardarelli et al. (2005), e o Método DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit.

#### **3.5.1 – Amostras utilizadas na avaliação dos métodos**

Foram utilizados quatro (4) tipos de amostras de alimentos contendo soja RR obtidas a partir de processos de fabrica o distintos. Cada amostra foi extraída quatro vezes, em dias diferentes, em duplicata:

- Proteína texturizada de soja (PTS) obtida pelo processo de extrusão termoplasm tica do farelo desengordurado cru, de alto grau de processamento, contendo 0,03% de soja RR (quantificada no INCQS).
- Fórmula infantil contendo proteína isolada de soja obtida pelo processo de extração do farelo desengordurado e recuperação da proteína da soja, de moderado grau de processamento, contendo 0,28% de soja RR (quantificada no INCQS). O produto é composto dos seguintes ingredientes: maltodextrina, proteína isolada de soja, óleo de palma, óleo de semente de colza, óleo de coco, óleo de girassol, citrato tripotássico, carbonato de cálcio, difosfato tricálcico, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, L-metionina, cloreto de cálcio, ácido ascórbico, cloreto de colina, taurina, meso-inositol, L-carnitina, sulfato ferroso, sulfato de zinco, vitamina E, niacinamida, pantotenato de cálcio, vitamina B2, vitamina A, vitamina B1, sulfato de cobre, vitamina B6, iodeto de potássio, ácido f lico, vitamina K, biotina, vitamina D e vitamina B12,  cido cítrico, hidróxido de potássio.

- Extrato de soja, obtido por extração aquosa dos grãos da soja, de moderado grau de processamento, contendo 0,1% de soja RR (quantificada no INCQS).
- MRC 5% composto por soja em pó obtida diretamente por moagem e secagem dos grãos de soja, de baixo grau de processamento.

### 3.5.2 - Avaliação da concentração, rendimento e pureza do DNA

A avaliação foi feita através da estimativa da concentração do DNA extraído das amostras e do material de referência, por medida espectrofotométrica da densidade ótica (DO) a 260nm ( $A_{260}$ ) e 280nm ( $A_{280}$ ) em espectrofotômetro GeneQuant *pro* (Amersham Biosciences) com cubeta de quartzo e capilares de 0,05mm e a pureza das soluções de DNA foi verificada através da relação entre  $A_{260} / A_{280}$  e  $A_{260} / A_{230}$ . As soluções de DNA foram depois submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de brometo de etídio, em TBE 1X a 80V por 30 minutos. A sensibilidade das preparações foi avaliada por PCR qualitativo pela amplificação do gene da lectina (MEYER et al, 1996).

### 3.5.3 - Verificação da presença de substâncias inibidoras no DNA extraído do MRC 0% e em grãos de soja

A presença de substâncias inibidoras da PCR em tempo real foi avaliada através da amplificação do gene da lectina (*Le 1*) em duas (2) soluções de DNA extraídas do MRC de soja RR<sup>®</sup> 0% pelo método CTAB e três (3) soluções de DNA extraídas de grãos de soja não-GM, pelo método CTAB. As soluções foram ajustadas a 40ng/ $\mu\text{L}$  e diluídas em série a 1:4 com água purificada (1:4, 1:16, 1:64, 1:256), conforme descrito em JRC (2007). As soluções de DNA não diluído e as soluções com as diluições seriadas (10; 2,5; 0,625 e 0,15625 ng/ $\mu\text{L}$ ) foram amplificadas em duplicata e construídas as curvas de calibração entre o log da concentração de DNA e os Cts obtidos na amplificação da lectina.

Foi calculada a diferença ( $\Delta\text{Ct}$ ) entre o Ct obtido experimentalmente na amplificação da lectina presente no DNA não diluído (Ct medido) e o Ct correspondente à amplificação da lectina na solução de DNA contendo 40 ng/ $\mu\text{L}$  calculado através da regressão linear (Ct calculado).

### **3.5.4 – Avaliação dos métodos de extração de DNA na quantificação pela PCR em tempo real**

A avaliação dos protocolos de extração de DNA pelo Método CTAB e pelo Método DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit foi realizada comparando-se as curvas de calibração obtidas com o DNA extraído do MRC 5%, em três extrações realizadas em diferentes dias, diluído em água purificada de modo a conter 132800, 33200, 8300, 2075, 1037, 520 e 260 cópias de lectina e 6640, 1660, 415, 100, 50, 25 cópias de p35S em 25 µL da reação de PCR em tempo real. Cada diluição foi analisada em triplicada em cada corrida. O número de cópias em cada diluição foi estimado considerando-se o valor da massa do genoma haploide de *Glycine max* (valor 1C) de 1,13 pg (BENETT & LEITCH, 2004).

Foram avaliados os parâmetros de coeficiente angular, coeficiente de correlação linear e eficiências das curvas analíticas obtidas na amplificação dos alvos lectina e p35S, resultantes do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para verificar o coeficiente angular e desvios de linearidade (lack-of-fit,  $\alpha = 0.05$ ).

A comparação entre os métodos foi feita através da análise de variância (ANOVA), fator único,  $\alpha = 0,05$ , utilizando a distribuição de Snedecor.

### **3.6 - Avaliação dos parâmetros de desempenho do método que tem como alvo a região do promotor 35S (método de triagem) utilizando o “TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit”**

#### **3.6.1 - Curvas analíticas e eficiência da amplificação**

Para o estudo das curvas analíticas foram realizadas cinco (5) curvas com as mesmas extrações de DNA do MRC de soja RR<sup>®</sup> (0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5%) (100ng/µL), analisados em triplicada em cada corrida, aplicando-se o método  $\Delta Ct$ .

Foram avaliados os seguintes parâmetros resultantes do cálculo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, determinados pela fórmula que representa a equação da reta:  $y = ax + b$

- coeficiente angular ou inclinação da reta (a)
- intercepto da reta (b)

Também foram avaliados o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ), a variação dos  $\Delta Ct$  e a eficiência da reação de PCR que foi calculada pela fórmula (BUSTIN & NOLAN, 2004) conforme segue:

$$E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$$

### **3.6.2 - Precisão e Exatidão**

#### **3.6.2.1 - Reprodutibilidade das medidas dos Cts (precisão intercorridas)**

A reprodutibilidade do método foi avaliada através das medidas dos Cts obtidos na quantificação de mesmas soluções de DNA extraídas dos MRC de soja RR<sup>®</sup> contendo 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5% (100ng/ $\mu$ L), analisados em triplicada em cada uma das cinco (5) corridas que foram realizadas em curtos períodos de tempo pelo mesmo operador utilizando o mesmo equipamento.

Os resultados foram expressos através dos coeficientes de variação (CV%) obtidos para os alvos lectina e p35S nas diferentes concentrações do MRC.

#### **3.6.2.2 – Reprodutibilidade do método na quantificação do número de cópias de lectina e de soja RR (precisão intercorridas)**

A precisão do método na quantificação dos dois alvos foi avaliada, separadamente, pela análise do número de cópias de lectina e de p35S utilizando-se soluções de DNA obtidas da extração do MRC de soja RR 5% diluído em água purificada de modo a conter 88500, 17700, 4400, 880 e 440 cópias de lectina e 4425, 885, 221, 44 e 22 cópias de p35S em 25  $\mu$ L da reação de PCR em tempo real.

Foram realizadas quatro (4) corridas independentes com diferentes extrações de DNA e cada diluição foi analisada em duplicata.

O número de cópias foi calculado através das curvas de regressão linear e os resultados expressos através das médias, desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV%) encontrados para os alvos lectina e p35S.

### **3.6.2.3 – Repetitividade (precisão intracorrída) e Exatidão na quantificação relativa**

A repetitividade do método foi avaliada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) através da quantificação dos DNA obtidos em quatro (4) extrações do MRC de soja RR<sup>®</sup> contendo 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5% utilizando o método CTAB. Cada concentração foi analisada em triplicata. Os resultados foram expressos através dos coeficientes de variação (CV%) de cada concentração.

A exatidão do método foi avaliada da mesma forma que a precisão e os resultados foram expressos como erro relativo (ER) calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Erro relativo} = \frac{(\text{valor medido} - \text{valor real})}{\text{valor real}} \times 100$$

### **3.6.3 - Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ) absolutos e relativos**

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) absolutos e relativos foram estimados experimentalmente através de quatro (4) corridas utilizando-se três (3) extrações de DNA do MRC de soja RR<sup>®</sup> 5%, diluídas em DNA extraído do MRC de soja não geneticamente modificada, contendo aproximadamente 4425, 885, 221, 44, 22, 11 e 5,5 cópias de p35S em 25 µL da reação de PCR em tempo real. Cada diluição foi analisada em triplicata.

## **3.7 - Desenvolvimento do método de quantificação evento específico**

### **3.7.1 - Seleção dos iniciadores e sondas para os alvos lectina e soja RR**

A sequência do gene da lectina de soja está descrita no banco de dados EMBL acesso nº K00821 e a sequência evento-específica da soja RR, localizada na região correspondente à junção 5'promotor35S / genoma da planta, está descrita em EMBL acesso nº AJ 308514.

Todos os iniciadores e as sondas foram desenhados pelo programa "Primer Express<sup>®</sup> versão 2.0.0 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001b) utilizando os parâmetros previamente estabelecidos pelo programa, sendo a T<sub>m</sub> dos iniciadores em torno de 58-60°C e a T<sub>m</sub> das sondas 10°C acima, conteúdo GC mínimo de 30% e máximo 80% e



Tm máxima do produto de amplificação de 85°C. O tamanho do produto de amplificação foi aleatoriamente fixado entre 80 e 130 pares de bases. As sondas MGB foram marcadas na posição 5' com o corante fluorescente FAM (6'-carboxyfluorescein) para o alvo RR e com o corante fluorescente VIC (2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein) para o alvo lectina e na posição 3' com a molécula MGBNFQ – (*minor groove binder non-fluorescent quencher*). Uma das sondas testadas para o alvo lectina foi marcada na posição 3' com o corante TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine) com função *quencher*.

Os iniciadores e sondas foram verificados quanto à formação de grampos e de dímeros pelo programa Primer<sup>®</sup> Express, pelo programa “Bioedit Sequence Alignment Editor” para verificação da formação de possíveis alinhamentos entre os iniciadores e as sondas e pelo programa de alinhamento de sequências BLAST (NCBI- Basic Local Alignment Search Tool).

Os iniciadores selecionados foram sintetizados pela Invitrogen<sup>®</sup> Brasil Ltda e as sondas foram sintetizadas pela Applied Biosystems.

### **3.7.2 - Avaliação da especificidade e sensibilidade dos iniciadores selecionados**

#### **3.7.2.1 – Espécies vegetais e amostras de alimentos**

Nos ensaios de avaliação da especificidade, os iniciadores e sondas selecionados para amplificação do alvo lectina foram testados frente aos DNA extraídos das seguintes espécies de vegetais filogeneticamente relacionadas e utilizadas na produção de alimentos:

- *Glycine max* L. Merr. (soja) farinha de soja (MRC 0%, 0,1%, 0,5%)
- *Glycine max* L. Merr (soja) cultivar M98-1280 (não GM) produzida pela Monsanto S.A.
- *Zea mays* L. (milho) farinha de milho Bt 176, milho MON 810 e milho GA21 (MRC 0,1%)
- *Oriza sativa* L.(arroz)
- *Avena sativa* L. (aveia)
- *Triticum aestivum* L. (trigo)
- *Hordeum vulgare* (cevada)
- *Phaseolus vulgaris* L. (feijão)

- mistura de 7 cereais integrais: arroz integral, arroz selvagem, trigo integral, aveia integral, cevada, centeio e triticale.

Os iniciadores e sondas para amplificação do alvo soja RR foram testados frente aos DNA extraídos das seguintes espécies de vegetais geneticamente modificados utilizados na produção de alimentos:

- *Glycine max* (soja) MRC 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5%
- *Zea mays* milho Bt 176 (MRC 0,1%)
- *Zea mays* milho MON 810 (MRC 0,1%)
- *Zea mays* milho Bt11 (MRC 0,1%)
- *Zea mays* milho GA21 (MRC 0,1%)
- Folha de feijão evento Olathe M1-4
- Folha de feijão evento Olathe 5.1

Na avaliação da especificidade e sensibilidade, os iniciadores e sondas para amplificação do gene da lectina foram testados frente a várias amostras de alimentos, contendo ou não soja RR<sup>®</sup>:

- soja em grão
- bebidas a base de soja com frutas
- sopa desidratada
- salsicha
- carne vegetal
- fórmula infantil
- proteína texturizada de soja
- mistura para panquecas
- farinha de trigo
- biscoito
- massa alimentícia mista instantânea
- farinha de milho

Os iniciadores e sondas para amplificação do alvo RR foram testados frente a várias amostras de alimentos, quantificadas no INCQS com o “TaqMan GMO 35S Soy Detection kit”:

- soja em grão (0%, 0,62% e maior que 5%)
- bebida a base de soja com frutas (0,25% e 0,01%)
- proteína texturizada de soja –PTS (0%, 0,75% e maior que 5%)
- sopa desidratada (0,42 e 2,54%)
- carne vegetal (0,06%)
- farinha de soja (0% e 0,09%)
- farelo de soja (maior que 5%)
- salsicha (0,58%)
- fórmula infantil (0,02% e 0,06%)
- extrato de soja (0%)
- hamburguer de carne bovina e de frango (0%)

### 3.7.2.2 – PCR qualitativo para avaliação dos iniciadores da lectina e da soja RR

As reações de PCR qualitativo foram realizadas em volume total de 25 µL contendo tampão de PCR 1X (10 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl), 160 µM da mistura de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,5U da enzima *Taq* DNA polimerase, 240 nM de cada par de iniciadores e 2,5 µL de DNA molde (100 a 200 ng) (CARDARELLI et al., 2005). Na reação de PCR com os iniciadores LecF 1218/LecR 1332 foram utilizados 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Foi utilizado o termociclador modelo 7400 (Applied Biosystems) nas condições de termociclagem de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 57°C e 60°C por 30 segundos (conforme os iniciadores), 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 3 minutos. As temperaturas de anelamento dos iniciadores foram calculadas pela equação de Wallace (WALLACE et al., 1979):

$$T_a = 4 (G+C) + 2 (A+T) - 5.$$

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) contendo 0,3 µg/mL de brometo de etídio imerso em tampão TBE 1X (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA pH 8,4) e visualizados por meio de luz ultravioleta.

### **3.7.2.3 – Avaliação da especificidade dos iniciadores selecionados por PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green**

Os iniciadores foram testados com soluções de DNA extraídas do MRC de soja RR<sup>®</sup> e também com as soluções de DNA extraídas dos vegetais descritos no item 3.7.2.1.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume total de 25 µL contendo o reativo Power SYBR<sup>®</sup> Green (1X) (corante SYBR Green<sup>®</sup>, AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, referência passiva e tampão 10 nM Tris HCl pH 8,3; 50 nM KCl), 240 nM de cada par de iniciadores e 2,0 µL de DNA molde (100 a 200 ng).

A termociclagem foi realizada a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Após a reação de PCR foi realizada a Curva de Dissociação, para análise das temperaturas de desnaturação (T<sub>m</sub>), a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e aquecimento lento até 95°C (APPLIED BIOSYSTEMS, 2003).

### **3.7.2.4 – Avaliação da especificidade e sensibilidade dos iniciadores selecionados por PCR em tempo real pelo sistema TaqMan**

Os iniciadores foram testados com soluções de DNA extraídas do MRC de soja RR<sup>®</sup> (0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5%), soluções de DNA extraídos dos vegetais não geneticamente modificados, e com DNA extraído das amostras de alimentos listadas no item 3.7.2.1.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume total de 25 µL contendo TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (1X), (AmpliTaQ Gold<sup>®</sup> DNA polimerase, dNTPs, referência passiva e tampão 10 nM Tris HCl pH 8,3; 50 nM KCl), 250 nM de cada iniciador, 250 nM da sonda e 2,0 µL de DNA molde (100 a 200 ng). Nas reações para verificação da sensibilidade com amostras de alimentos foram também realizadas reações de PCR contendo 900 nM dos iniciadores Mlec-F/Mlec-R e LecF 1663/LecR 1773.

A termociclagem com os iniciadores e sondas do alvo lectina foi realizada a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. No caso dos iniciadores do alvo RR a termociclagem foi realizada a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 57°C por 60 segundos.

### 3.8 - Avaliação dos parâmetros de desempenho do método que tem como alvo a região evento específica pelo sistema TaqMan

#### 3.8.1 - Otimização das concentrações dos iniciadores da reação de PCR em tempo real utilizando concentração fixa das sondas (250nM).

A verificação da concentração ótima dos iniciadores foi realizada através de uma matriz dos iniciadores na direção 5'-3' e inverso (3'-5') nas concentrações de 50nM, 300nM e 900nM com o objetivo de determinar a menor concentração dos iniciadores que produzem o menor Ct com um máximo de  $\Delta R_n$  (intensidade de emissão de fluorescência do *reporter* – linha de base), conforme esquema abaixo (Applied Biosystems, 2003):

Iniciador inverso (nM)	Iniciador na direção (5'-3') (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

Na matriz foi utilizada uma solução de DNA extraído do MRC de soja 5% na concentração final de 200 ng de DNA em 25  $\mu$ L de reação de PCR em tempo real. A termociclagem com os iniciadores do alvo RR foi realizada a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 57°C por 60 segundos.

#### 3.8.2 - Curvas analíticas e eficiência da amplificação

Para o estudo das curvas analíticas foram realizadas dez (10) curvas com extrações de DNA do MRC de soja RR<sup>®</sup> 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5% (100ng/ $\mu$ L), analisados em duplicata em cada corrida.

Foram avaliados os parâmetros de coeficiente angular, coeficiente de correlação linear e eficiência das curvas analíticas resultantes do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A análise de variância (ANOVA) foi aplicado para verificar o coeficiente angular e desvios de linearidade (lack-of-fit,  $\alpha = 0.05$ ).

### **3.8.3 - Reprodutibilidade das medidas dos Cts (precisão intercorridas)**

A reprodutibilidade do método foi avaliada através das medidas dos Cts obtidos na quantificação de mesmas soluções de DNA extraídas dos MRC de soja RR<sup>®</sup> contendo 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5% (100ng/μL), analisados em duplicata em cada uma das dez (10) corridas que foram realizadas em períodos distintos pelo mesmo operador utilizando o mesmo equipamento.

Os resultados foram expressos através dos coeficientes de variação (CV%) nas diferentes concentrações do MRC.

### **3.8.4 – Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de soja RR (precisão intercorridas)**

A precisão também foi avaliada em cinco (5) corridas independentes através da quantificação do MRC 5% diluído contendo 4425, 885, 221, 44 e 22 cópias de soja RR. O número de cópias foi calculado através da fórmula da curva de regressão e os valores foram expressos através da média e coeficiente de variação.

## **3.9 - Avaliação dos parâmetros de desempenho do método que tem como alvo o gene da lectina pelo sistema TaqMan**

### **3.9.1 - Otimização das concentrações dos iniciadores da reação de PCR em tempo real utilizando concentração fixa das sondas (250nM).**

A otimização das concentrações dos iniciadores foi realizada conforme descrito para o alvo RR (item 3.8.1). Somente a temperatura de anelamento da termociclagem foi modificada para 60°C.

### **3.9.2 - Curvas analíticas e eficiência da amplificação**

Para o estudo das curvas analíticas foram realizadas sete (7) corridas utilizando MRC 5% diluído de forma a obter 88500, 17700, 4425, 880, 440 e 220 cópias de lectina, em duplicata. Foram avaliados os coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ) e a sensibilidade foi medida através da inclinação da reta (coeficiente angular) que corresponde à eficiência da reação de PCR em tempo real. A análise de variância

(ANOVA) foi aplicada para verificar o coeficiente angular e os desvios de linearidade (teste do lack of fit,  $\alpha = 0,05$ ).

### **3.9.3 - Reprodutibilidade das medidas dos Cts (precisão intercorridas)**

A reprodutibilidade do método foi avaliada através das medidas dos Cts obtidos com soluções de DNA extraídas dos MRC de soja RR<sup>®</sup> em sete (7) corridas que foram realizadas em períodos distintos pelo mesmo operador utilizando o mesmo equipamento. Os resultados foram expressos através da média dos Cts, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%).

### **3.9.4 - Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de lectina (precisão intercorridas)**

A precisão também foi avaliada nas sete (7) corridas independentes através da quantificação do MRC 5% diluído contendo 88500, 17700, 4425, 880, 440 e 220 cópias de lectina. Os resultados foram expressos através da média dos Cts, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%).

### **3.10 – Quantificação do teor de soja RR em 02 matrizes de alimentos utilizando o método desenvolvido**

A aplicabilidade do novo método foi avaliada através da quantificação de uma amostra de biscoito contendo 2,4% de soja RR; de uma amostra constituída por mistura de farinhas contendo 1,48% de soja RR e da quantificação do MRC 0,5%. Como controle negativo da reação do alvo RR foi utilizada, em todas as corridas, uma amostra de mistura de farinhas com 0% de soja RR. Foram realizadas quatro corridas para quantificar a amostra de biscoito e três corridas para quantificar a amostra de mistura de farinhas e do MRC 0,5%, sendo que cada amostra foi analisada em duplicada. Foram preparadas duas curvas analíticas com o MRC 5% diluído para amplificação do gene da lectina contendo 88500, 17700, 4425, 880, 440 e 220 cópias e com 4425, 885, 221, 44 e 22 cópias para amplificação do gene RR. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume total de 25  $\mu$ L contendo TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (1X), 300 nM de cada iniciador, 250 nM da sonda e 2,0  $\mu$ L de DNA molde (100 a 200 ng). A termociclagem foi realizada a 95°C por 10 minutos,

seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto para o alvo da lectina e 57° por 1 minuto para o alvo RR.

O cálculo do número de cópias de cada alvo da amostra foi obtido por interpolação com as curvas analíticas e o percentual de OGM foi calculado pela fórmula:

$$\% \text{ OGM} = \frac{\text{número de cópias de soja RR}}{\text{número de cópias de lectina}} \times 100$$

Após o cálculo do teor de OGM foi calculado o erro relativo da quantificação.

### **3.11 - Quantificação de amostras de alimentos utilizando o “TaqMan® GMO 35S Soy Detection kit”**

Foram quantificadas 68 amostras de alimentos processados e *in natura* contendo soja geneticamente modificada (listadas no item 3.1.6). As amostras foram coletadas no comércio varejista e/ou indústria de alimentos, no período de 2004 a 2008, em cidades localizadas na região sul e região sudeste, pelas autoridades sanitárias como parte de programas de monitoramento.

O total de 1 kg das amostras sólidas secas em pó, consistindo de 2 até 5 embalagens, foi transferido para embalagens plásticas e homogeneizado manualmente por inversão 50 vezes. As amostras com baixo teor de umidade como biscoitos, massas, sopas desidratadas, grãos e rações para animais, foram trituradas em moinhos (M20 Mill, IKA Works) até obtenção de um pó fino, e homogeneizadas manualmente. Os alimentos sólidos com alto teor de umidade como produtos cárneos produtos vegetais e alimentos congelados foram triturados em agitador mecânico tipo “blender” (Waring Prod. Division). Após trituração, as amostras foram peneiradas em peneiras de 0,8 e 1,6 mm. As amostras de bebidas a base de soja e frutas (1L) foram homogeneizadas por agitação manual e posteriormente transferidas em alíquotas de 1 mL para microtubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, centrifugados a 13000 xg por 10 minutos em centrífuga não refrigerada e o sedimento foi utilizado para proceder à extração. Toda a manipulação das amostras foi realizada em área exclusiva para trituração e homogeneização de alimentos e sob estritas condições de assepsia para evitar contaminações cruzadas.



O DNA das amostras foi extraído em triplicata pelo método CTAB, descrito em Cardarelli et al (2005) e as concentrações foram estimadas em espectrofotômetro. Na reação de PCR em tempo real foram utilizados 2,5 µL de DNA molde de 80 a 100 ng. Cada réplica foi analisada pelo kit “TaqMan® GMO 35S Soy Detection através de 2 pontos na corrida de PCR em Tempo Real e os resultados calculados pela média das réplicas. A curva analítica foi construída com o logaritmo das concentrações do MRC de soja RR® (0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5%) versus o  $\Delta C_t$  e a percentagem de soja geneticamente modificada foi calculada através dos  $\Delta C_t$  obtidos com as amostras.

Em todas as corridas foi utilizado o MRC de soja RR® a 1% como controle interno da qualidade e os resultados da quantificação desse material de referência foram avaliados no Gráfico de Controle de Shewhart que é utilizado como ferramenta analítica no controle dos resultados das análises de OGM realizadas no INCQS (CARDARELLI-LEITE, FERREIRA e BRANQUINHO, *in press*).

## **4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 – Avaliação dos dois métodos de extração de DNA**

#### **4.1.1 - Extração de DNA: pureza e rendimento**

A extração do DNA genômico é uma etapa fundamental na análise de alimentos por métodos baseados na PCR. Como os vários métodos de extração diferem significativamente na pureza e no rendimento final, isto pode afetar enormemente a qualidade dos resultados das determinações qualitativas e quantitativas (OLEXOVÁ et al, 2004).

Vários estudos de comparação dos métodos de extração têm sido publicados na tentativa de se determinar o método mais apropriado para cada tipo de matriz de alimento, visando minimizar a influência da extração na variabilidade da amplificação de DNA na PCR, principalmente na quantificação de reduzidos números de cópias por PCR em tempo real (CORBISIER et al., 2007; Di BERNARDO et al., 2007; Di PINTO et al., 2007; DEMEKE e JENKINS, 2010; FERRARI et al., 2007; GRYSOON, MESSENS e DEWETTINCK, 2004; OLEXOVÁ et al., 2004; ROTT, et al., 2004; SMITH et al., 2005; ZIMMERMANN, LÜTHY e PAULI, 1998).

Neste trabalho foram comparados dois métodos de extração de DNA: o método CTAB, conforme descrito em Cardarelli et al (2005), e o método que utiliza o “DNeasy® Plant mini kit – Qiagen”.

O método CTAB tem sido amplamente utilizado para extração de DNA a partir de folhas, sementes/grãos e amostras de alimentos processados e de ração animal (ISO 21571, 2005) e envolve basicamente a extração e precipitação do DNA e outros polímeros como polissacarídeos e polifenóis pelo detergente aniônico CTAB e posterior purificação do DNA com clorofórmio/isopropanol e etanol 70%. O método utilizado neste trabalho se baseia nas modificações feitas por Lipp et al. (1999), sem a etapa da lavagem com etanol.

O método DNeasy® tem sido utilizado para extração de DNA de uma série de matrizes de alimentos (DEMEKE e JENKINS, 2010). Por este método, as amostras são lisadas através de tampão de lise com RNase A. Os constituintes celulares são retirados através da minicoluna QIAshredder e posterior precipitação das proteínas e polissacarídeos por tampão contendo hidrocloreto de guanidina. O DNA se liga à uma membrana de sílica-gel e é eluído em tampão com baixa concentração de sal.

Foram utilizados 100 mg das amostras de PTS, fórmula infantil, extrato de soja e 50 mg do MRC de soja RR 5%. As amostras foram submetidas a quatro (4) extrações, em dias diferentes, pelos dois métodos, em duplicata. A quantidade das amostras de alimentos foi fixada em 100 mg uma vez que já foi observado que o total de DNA extraído não aumenta linearmente com a quantidade da amostra ocorrendo um efeito de saturação independentemente do método de extração utilizado (ZIMMERMANN, LÜTHY e PAULI, 1998).

A quantidade e qualidade do DNA extraído de amostras de alimentos são geralmente influenciadas por vários fatores sendo os principais a amostragem, o tamanho da amostra, o tipo de matriz, a presença de substâncias inibidoras presentes na matriz do alimento, o grau de dano do DNA (relativo ao grau de depurinação das bases nitrogenadas) e o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos após a extração. Esses fatores são dependentes da amostra em si, do processamento durante a produção do alimento e de parâmetros físicos e químicos dos métodos de extração utilizados (DEMEKE e JENKINS, 2009).

A eficiência dos dois métodos de extração foi determinada pela quantidade e qualidade do DNA genômico através da determinação espectrofotométrica da absorbância (DO) a 260 nm e a pureza do DNA foi avaliada a 230, 260 e 280 nm pela relação entre a absorbância a 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) e entre 260 nm e 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ). Os valores médios obtidos nas 4 extrações estão mostrados na Tabela 2.

Valores entre 1,8 e 2,0 para a relação entre  $A_{260}/A_{280}$  são indicativos de DNA pouco contaminado com material protéico ou substâncias aromáticas. Os valores acima de 2,0 para a razão entre  $A_{260}/A_{230}$  indicam remoção de substâncias inibidoras como polissacarídeos, sais, lipídeos e compostos fenólicos que interferem na reação de PCR (CORBISIER et al., 2007).

Pelos resultados de  $A_{260}/A_{280}$  observados nas extrações de todas as amostras, verificou-se que ambos os métodos forneceram DNA de boa qualidade independente do grau de processamento do alimento. Somente a extração do MRC 5% pelo método CTAB ficou um pouco abaixo de 1,8, indicando que ainda pode haver traços de proteínas nessas preparações.

Já em relação à remoção de substâncias interferentes verificada pela razão entre  $A_{260}/A_{230}$ , não foi observada grande diferença de valores entre os dois métodos de extração em relação à amostra de PTS e extrato de soja, resultando em DNA de boa qualidade. Quanto à amostra de fórmula infantil, o método CTAB foi muito mais eficiente que o método DNeasy, contrariando estudos que apontam os métodos de

extração que utilizam resinas de ligação como os mais eficientes na remoção de inibidores (Di BERNARDO et al, 2007). Na amostra de MRC 5%, que é preparada somente por moagem e homogeneização dos grãos, nenhum dos dois métodos forneceu preparações com alta pureza, indicando a presença de inibidores. Uma possível explicação pode ser a incapacidade dos métodos utilizados em compensar o elevado teor de lipídeos dos grãos de soja. Além disso, a ausência da etapa de lavagem com etanol 70%, que é importante para a remoção de resíduos do CTAB, pode ter contribuído para o baixo grau de pureza. Diferentes resultados foram obtidos por Corbisier et al. (2007) no estudo colaborativo envolvendo a extração do MRC de milho Bt176 2% por quatro métodos de extração, incluindo CTAB e método DNeasy, em que esses dois métodos forneceram as soluções de DNA de maior pureza.

Os dois métodos de extração também foram comparados em função da concentração de DNA em ng/ $\mu$ L, do coeficiente de variação (CV%) e do rendimento médio em  $\mu$ g de DNA em 100 mg de amostra, conforme Tabela 2 e Figura 5.

Os dois métodos utilizados mostraram-se eficientes na extração de DNA dos 4 tipos de amostras estudadas, com rendimento compatível com outros métodos já avaliados para extração de DNA de produtos alimentícios contendo soja e milho (Di PINTO et al., 2007; FERRARI et al., 2007; OLEXOVÁ et al., 2004; ROTT, et al., 2004).

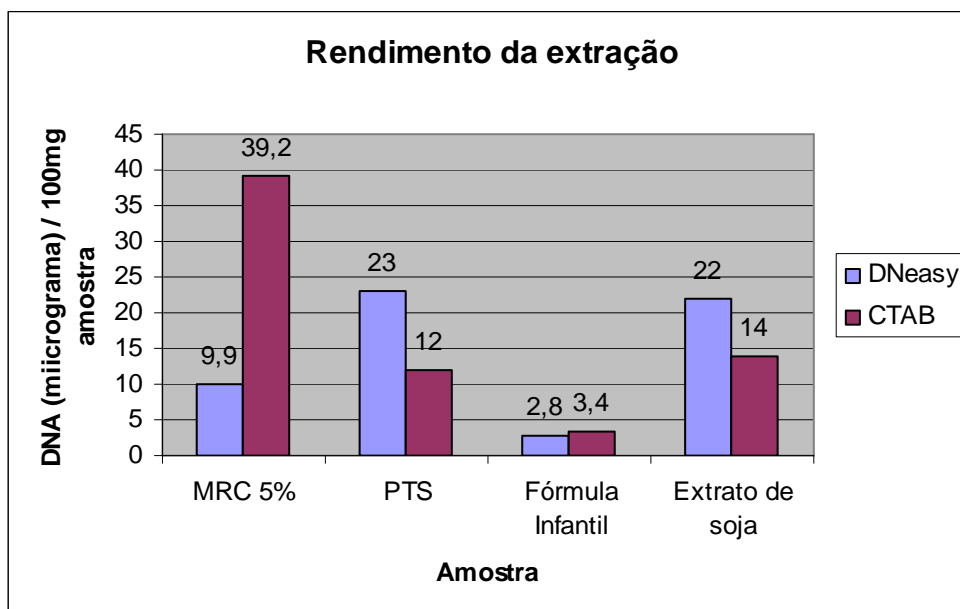
O método CTAB foi o que apresentou maior variação de resultados entre as várias extrações de todas as amostras com coeficiente de variação (CV%) acima de 20%, demonstrando dificuldade de reprodutibilidade do método. Já com o método DNeasy, a amplitude foi um pouco menor, se aproximando de coeficientes de variação encontrados em alguns estudos de validação de métodos de extração de DNA a partir de sementes e grãos de vários vegetais, publicados pelo JRC (CRL-GMFF, 2010; JRC, 2007).

Quanto ao rendimento, calculado pela média de DNA em  $\mu$ g por 100 mg de amostra, o método DNeasy forneceu rendimento bem maior do que o método CTAB na extração de DNA das amostras de PTS e Extrato de soja. Estes resultados são discordantes de estudos comparativos de métodos de extração de DNA em alimentos altamente processados, em que o método CTAB é apontado como um dos métodos que fornece maior rendimento (Di BERNARDO et al, 2007; SMITH et al, 2005). O método CTAB forneceu um rendimento muito maior na extração do MRC 5%, indicando que esse método foi mais eficiente somente na extração de amostras de baixo grau de processamento. Entretanto, esse alto rendimento também pode ser atribuído ao fato de que, como não houve tratamento com enzima RNase A, pode ter

ocorrido uma superestimativa da concentração uma vez que moléculas de RNA também absorvem a 260nm. Na amostra de fórmula infantil, o rendimento foi semelhante com os dois métodos.

**Tabela 2** - Resultados relativos à concentração de DNA, coeficiente de variação e pureza das preparações de DNA obtidas pelos dois métodos de extração:

Amostra	Método de extração	Faixa de concentração (ng/ $\mu$ L)	Conc.média (ng/ $\mu$ L) / CV%	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
MRC 5%	DNeasy <sup>®</sup>	68,5 $\leftrightarrow$ 36,0	49,50 / 28,0%	1,843 $\pm$ 0,214	1,051 $\pm$ 0,117
	CTAB	304 $\leftrightarrow$ 139,0	193,5 / 28,0%	1,728 $\pm$ 0,320	1,401 $\pm$ 0,645
Proteína texturizada (PTS)	DNeasy <sup>®</sup>	264,0 $\leftrightarrow$ 148,0	230,6 / 19,3%	1,853 $\pm$ 0,061	1,865 $\pm$ 0,198
	CTAB	173,5 $\leftrightarrow$ 101,0	124,1 / 31,5%	1,867 $\pm$ 0,051	2,099 $\pm$ 0,192
Fórmula infantil	DNeasy <sup>®</sup>	37,0 $\leftrightarrow$ 23,0	28,5 / 16,5%	1,911 $\pm$ 0,221	1,175 $\pm$ 0,673
	CTAB	57,0 $\leftrightarrow$ 20,0	34,7 / 30,6%	2,061 $\pm$ 0,461	2,112 $\pm$ 0,275
Extrato de soja	DNeasy <sup>®</sup>	288,0 $\leftrightarrow$ 126,0	219,9 / 26,6%	1,931 $\pm$ 0,219	1,871 $\pm$ 0,234
	CTAB	193,0 $\leftrightarrow$ 93,5	137,8 / 26,6%	1,818 $\pm$ 0,054	2,085 $\pm$ 0,315

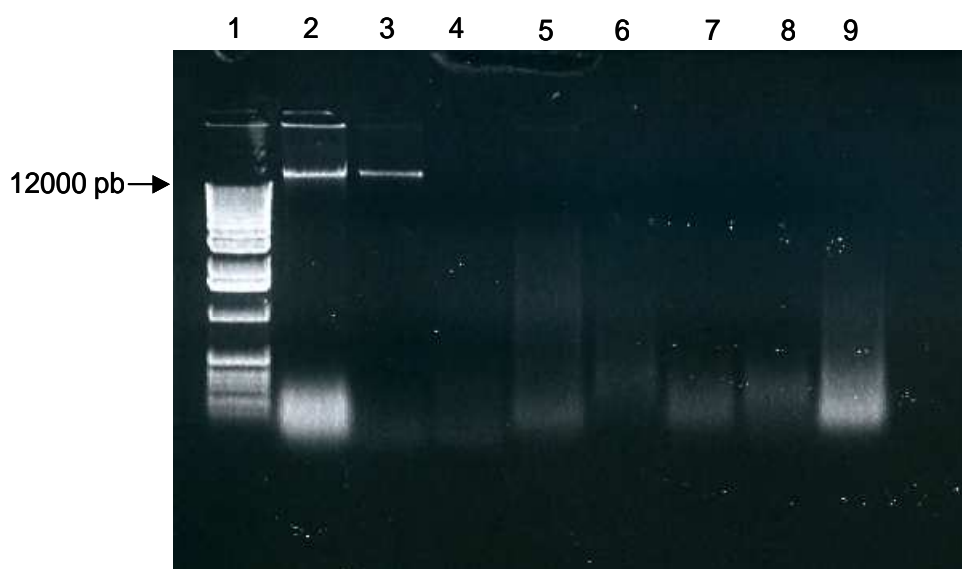


**Figura 5** - Rendimento médio dos dois métodos de extração (CTAB e DNeasy) em microgramas de DNA por 100 mg das amostras de alimentos

As soluções de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose e comparadas com um marcador de peso molecular de 1 Kb (Figura 6). Fragmentos maiores de 12 kb foram observados no DNA extraído do MRC 5% por ambos os métodos, sendo que na preparação obtida pelo método CTAB foi observado contaminação por moléculas de RNA. Já na preparação obtida pelo DNeasy kit (que utiliza tratamento com RNase A) a contaminação foi aparentemente menor. A ausência da banda de 12 kb nas outras preparações indica que o DNA extraído está substancialmente degradado, independente do método utilizado. Esta degradação deve estar relacionada ao grau de processamento (alto e moderado) das amostras de PTS, fórmula infantil e extrato de soja.

A sensibilidade destas preparações de DNA foi testada pela amplificação de uma região específica do gene da lectina, com produção de fragmentos de 118 pb. Foi verificado que as amplificações ocorreram com preparações de DNA contendo um mínimo de 400 pg de DNA do MRC 5%, 500 pg de DNA extraído da PTS, 150 pg de DNA extraído das amostras de fórmula infantil e de extrato de soja, não sendo observadas diferenças entre as preparações obtidas pelos dois métodos de extração. Estes valores são maiores do que os limites de detecção encontrados por Ferrari et al. (2007) na amplificação da lectina, com outros iniciadores, quando compararam o efeito de três protocolos derivados do método CTAB original: 5 pg com o DNA extraído de grãos de soja, 50 pg de DNA de farinha de soja e fórmula infantil e 500 pg de DNA extraído em amostra de leite de soja, pelo método CTAB com tratamento com RNase A, proteinase K, uma extração adicional com clorofórmio e lavagem final com etanol. Essas diferenças podem ter influenciado para que essas preparações contivessem quantidades menores de inibidores da PCR do que o método CTAB utilizado no nosso estudo. Marcelino, Guimarães e De-Barros (2008) estudando amostras de salsicha e de grãos de soja verificaram que a amplificação do gene da lectina era possível com pelo menos 100 ng de DNA extraído das amostras de salsicha e 100 pg de DNA de grãos de soja, tanto pelo método Wizard<sup>®</sup> como o método CTAB.

Ainda que o método de extração tenha efeitos altamente significativos na qualidade e quantidade de DNA extraído, estudo realizado por Di Bernardo et al. (2007) demonstrou que a adequação do método depende basicamente da matriz do alimento e, que não há nenhum método que seja abrangente a todas as amostras. A escolha do método mais apropriado depende da presença e do tipo de substâncias inibidoras, do grau de degradação e da quantidade do DNA presente na amostra.



**Figura 6** - Gel de agarose a 0,8% com as preparações de DNA de amostras de alimentos extraídas pelos métodos CTAB e DNeasy.

Pista 1: PM 1 kb (Gibco-BRL); pista 2: MRC 5% (CTAB); pista 3: MRC 5% (DNeasy kit); pista 4: PTS (DNeasy kit); pista 5: PTS (CTAB); pista 6: fórmula infantil (DNeasy kit); pista 7: fórmula infantil (CTAB); pista 8: extrato de soja (DNeasy kit); pista 9: extrato de soja (CTAB)

#### 4.1.2 - Verificação da presença de substâncias inibidoras nas extrações de DNA

Uma vez que a extração do MRC 5% pelo método CTAB forneceu soluções com aparente contaminação com substâncias que poderiam interferir na PCR em tempo real, realizou-se a pesquisa da presença de substâncias inibidoras pela técnica de diluições sucessivas e amplificação do gene da lectina. Foram analisadas duas soluções de DNA extraídas de sementes de soja não-GM (DNA 1 e 2) e 3 soluções extraídas do MRC 0% (DNA 3, 4 e 5) pelo método CTAB. As soluções foram diluídas a 1:4 em série e amplificadas em duplicata em 2 corridas de PCR em tempo real. Os resultados referentes aos coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ), inclinação da reta, intercepto, Cts medidos das diluições do DNA, Cts calculados do DNA não diluído e a diferença entre eles ( $\Delta C_t$ ) estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Resultados dos ensaios de verificação da presença de substâncias inibidoras em DNA de soja não-GM

DNA	R <sup>2</sup>	inclinação	intercepto	Ct medido 40 ng/μL	1:4	1:16	1:64	1:256	Ct calculado	ΔCt
1	0,9990	-3,5030	33,577	27,96	30,99	32,15	34,31	36,40	27,96	0,00
2	0,9982	-3,5345	33,923	28,16	30,38	32,61	34,48	36,85	28,26	0,10
3	0,9992	-3,5628	32,213	26,41	28,59	30,84	33,03	35,01	26,50	0,09
4	0,9983	-3,4565	31,502	25,87	28,05	30,20	32,05	34,37	25,96	0,09
5	0,9974	-3,6143	32,145	26,54	28,40	30,91	32,87	35,00	26,35	0,19

Os ΔCts obtidos foram menores do que 0,5 e os valores da inclinação da reta ficaram entre -3,6143 e -3,4565. Esses resultados são indicativos de ausência ou presença de pequena quantidade de substâncias inibidoras nas soluções de DNA (ENGL, 2008; ŽEL et al., 2008). Além disso, pode-se observar que a diferença entre os Cts das diluições seriadas se encontra próxima de 2 que é o ideal para soluções de DNA diluídas 1:4 (CODEX ALIMENTARIUS, 2010), significando ausência de inibidores que possam interferir na reação de PCR em tempo real.

#### 4.1.3 – Avaliação dos dois métodos de extração de DNA na quantificação pela PCR em tempo real

Além da quantidade e qualidade do DNA extraído serem essenciais para uma quantificação confiável, a eficiência da reação por PCR em tempo real é um parâmetro crucial na confiabilidade dos resultados quantitativos e, portanto foi utilizada como critério para se avaliar o desempenho dos dois métodos de extração na quantificação dos alvos lectina e p35S.

A avaliação da extração de DNA pelo método CTAB e pelo método DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit foi realizada através dos parâmetros das curvas analíticas obtidas pela amplificação de DNA extraído do MRC 5%, em três extrações realizadas em dias diferentes, diluído em água purificada de modo a conter 132800, 33200, 8300, 2075, 1037, 520 e 260 cópias de lectina e 6640, 1660, 415, 100, 50, 25 cópias do promotor p35S em 25 μL da reação de PCR em tempo real utilizando o “TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit”. Cada diluição foi analisada em triplicata em cada corrida. Esses parâmetros foram avaliados através da ANOVA, aplicada para verificar o coeficiente angular e desvios de linearidade (lack-of-fit,  $\alpha = 0,05$ ).



Os parâmetros de coeficiente angular, coeficiente de correlação  $R^2$  e eficiência da reação estão demonstrados na Tabela 4. Os valores do coeficiente de correlação  $R^2$  ficaram acima de 0,98 em todas as corridas que utilizaram o DNA extraído pelo DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini kit e pelo método CTAB na amplificação da lectina, demonstrando proporcionalidade entre o número de cópias e os Cts. Em relação à amplificação do p35S, em duas corridas com DNA extraído pelo método CTAB esse coeficiente ficou abaixo de 0,98 demonstrando menor correlação. Neste caso, a possível presença de impurezas aliada ao fato de que a menor concentração utilizada na curva (25 cópias) está abaixo do limite de quantificação estimado de 40 cópias pode ter prejudicado a amplificação do alvo p35S. Nas curvas de amplificação do alvo p35S com DNA extraído pelo DNeasy<sup>®</sup> todos os valores se situaram acima de 0,98. Os coeficientes angulares obtidos em todas as corridas (entre -3,6135 e - 3,3028) indicaram grande sensibilidade na reação de quantificação, correspondendo a um valor de 89% a 100% de eficiência da amplificação. Tanto o método CTAB como o DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini kit forneceram preparações de DNA que amplificaram os alvos lectina e p35S com semelhante eficiência, indicando que ambos os métodos forneceram soluções de DNA apropriadas para quantificação.

Smith e Maxwell (2007) analisaram os coeficientes de correlação e a eficiência das curvas analíticas obtidas na amplificação por PCR em tempo real do gene *ivr1* em amostras de farinha de milho extraídas por quatro métodos de extração entre eles, o método CTAB e o DNeasy Plant Max kit. Entre esses dois métodos, o DNeasy Plant Max kit demonstrou uma eficiência maior do que o CTAB.

A análise de variância demonstrou ajuste das curvas de regressão e ausência de desvios de linearidade nas seis (6) corridas para o alvo lectina utilizando-se DNA extraído pelos dois métodos de extração e nas três (3) corridas para o alvo p35S utilizando-se DNA extraído pelo DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit.

Nas três (3) corridas de amplificação do alvo p35S utilizando DNA extraído pelo método CTAB verificou-se ajuste das curvas em todas as corridas e desvio de linearidade em somente uma corrida.

**Tabela 4** - Parâmetros das curvas analíticas da amplificação de lectina e de p35S em preparações de DNA extraídos pelos dois métodos de extração.

Alvo	Método	Coefficiente de correlação (R <sup>2</sup> )	Coefficiente angular (Inclinação)	Eficiência
Lectina	CTAB	0,9965	-3,6135	89%
		0,9925	-3,6089	89%
		0,9980	-3,3679	98%
Lectina	KIT	0,9982	-3,4091	96%
		0,9974	-3,5017	93%
		0,9878	-3,5441	91%
p35S	CTAB	0,9742	-3,4123	96%
		0,9649	-3,5665	90%
		0,9814	-3,3028	100%
p35S	KIT	0,9891	-3,3826	97%
		0,9946	-3,5385	92%
		0,9910	-3,5958	90%

Na comparação entre os métodos utilizou-se a média dos valores de Cts obtidos para cada alvo nas três corridas. A análise de variância (ANOVA) desses valores nas curvas analíticas de cada alvo, utilizando-se DNA obtido pelos dois métodos de extração, não revelou diferenças significativas entre esses valores a um nível de significância de 0,05. Isto pode significar que, em termos de linearidade, não existe diferença entre as curvas analíticas da amplificação dos dois alvos, obtidas com soluções de DNA extraídos pelos dois métodos de extração do MRC 5%.

Corbisier et al. (2007) avaliaram a linearidade das curvas de calibração no estudo colaborativo de quantificação de milho Bt176 2% e não encontraram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre a eficiência das curvas de calibração obtidas com DNA extraídos pelos métodos CTAB e DNeasy.

Peano et al. (2004) avaliaram a influência de quatro métodos de extração na quantificação de soja RR e milho MON810 utilizando diferentes concentrações do MRC de cada evento, através de análise estatística baseada no test t-Student. A avaliação das curvas analíticas demonstrou que, na quantificação de soja RR, o método DNeasy não apresentou alta correlação com os valores esperados. Neste trabalho não foi avaliado o método de extração por CTAB.

O efeito de cinco métodos de extração de DNA na eficiência da PCR em tempo real na quantificação de MRC de soja RR 5% foi comparado por Cankar et al. (2006). Os resultados demonstraram que a eficiência dos métodos DNeasy Plant mini kit, CTAB, CTAB sem tratamento com proteinase K e RNase A, e GENESpin kit ficou próxima a 100% e que não houve diferenças significativas entre as amplificações dos

alvos lectina, p35S, tNOS e soja RR. Com o método de extração Wizard<sup>®</sup>, a dispersão dos valores da eficiência foi muito alta.

#### **4.2 - Avaliação dos parâmetros de desempenho do método que utiliza como alvo a região do promotor 35S (método de triagem) utilizando o “TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit”**

Os dados desta avaliação foram publicados por Branquinho, Ferreira e Cardarelli-Leite (2010).

##### **4.2.1 - Curvas analíticas e eficiência da amplificação**

Em cinco (5) corridas, os valores dos  $\Delta C_t$  foram calculados a partir da diferença entre os  $C_t$ s obtidos na amplificação do p35S e os obtidos na amplificação da lectina.

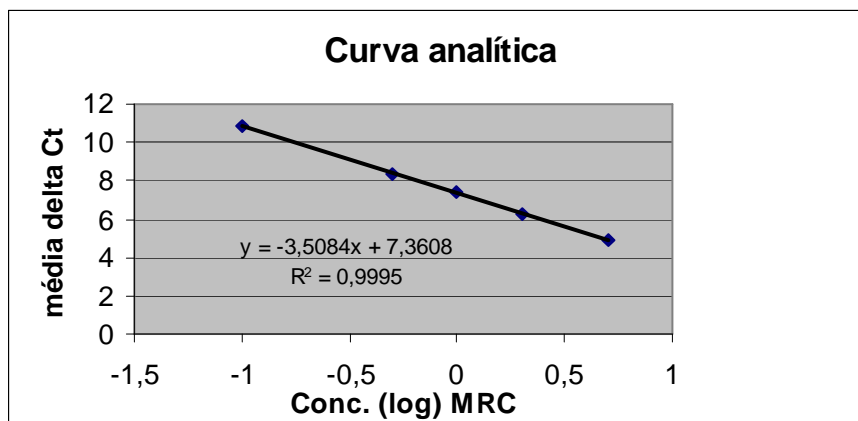
O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) demonstra o grau de correlação entre as concentrações e os  $\Delta C_t$ s resultantes das amplificações de ambos os alvos. Os valores obtidos nas 5 curvas variaram de 0,9953 a 0,9990, valores acima do mínimo aceitável de 0,98 (CODEX ALIMENTARIUS, 2010; ENGL, 2008), o que é indicativo da linearidade do método.

Nas análises de OGM, o intercepto (coeficiente linear) reflete a diferença entre os valores de  $C_t$  entre o alvo endógeno (lectina) e o MRC a 1%, sendo considerado 6,644 o valor ótimo para este parâmetro (TAVENIERS et al, 2004). Nas 5 corridas, o intercepto variou entre 6,6794 a 7,6481 com desvios entre 0,53 a 15% respectivamente, indicando certa variação na amplificação entre os dois alvos.

A inclinação da reta (coeficiente angular) indica a eficiência da amplificação para ambos os alvos e o valor ótimo de  $-3,324$  corresponde a 100% de eficiência (cálculo feito pela fórmula de cálculo da eficiência). Nas 5 corridas os valores variaram entre  $-3,6522$  a  $-3,3650$  correspondendo de 87,7% a 98,2% de eficiência. Esses valores se encontram acima do mínimo aceitável de 85%, conforme preconizado pelo ENGL (2008).

Os valores de  $\Delta C_t$  se situaram entre 4,31 (MRC 0,1%) e 11,42 (MRC 5%) nas 5 corridas. Esses valores são coincidentes com os encontrados por Marcelino, Guimarães e De-Barros (2008) quando avaliaram as curvas de  $\Delta C_t$  pelo mesmo método.

Os valores estão demonstrados na Tabela 5 e a curva analítica obtida pela média dos  $\Delta Ct$  das 5 curvas está demonstrada na Figura 7.



**Figura 7** – Curva analítica obtida pela média dos  $\Delta Ct$  das 5 curvas versus o logaritmo das concentrações do MRC (0,1, 0,5, 1, 2 e 5% de soja RR).

**Tabela 5** – Principais características das curvas analíticas na quantificação de OGMs pelo “TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit”:

Corrida	Coefficiente de correlação ( $R^2$ )	Coefficiente linear	Coefficiente angular (inclinação da reta)	Eficiência	Varição $\Delta Ct$
1	0,9953	7,6075	-3,5953	89,7%	4,94-11,06
2	0,9954	7,4419	-3,5560	91,0%	4,89-11,00
3	0,9989	6,6794	-3,3650	98,2%	4,31-10,04
4	0,9990	7,4185	-3,3806	97,6%	4,99-10,77
5	0,9964	7,6481	-3,6522	87,8%	5,28-11,42

#### 4.2.2 - Precisão e Exatidão

##### 4.2.2.1 - Reprodutibilidade (precisão intercorridas) das medidas dos Cts

Na amplificação do gene da lectina foram obtidos valores médios de Ct variando de 24,30 a 24,41 ciclos. Devido a fixa quantidade de DNA, não houve muita variação dos valores dos Ct entre as 5 concentrações analisadas. Dentre os 75 valores medidos o coeficiente de variação máximo foi de 3,89%.

Já em relação ao alvo p35S, a média dos valores dos Cts foram proporcionais à concentração analisada, variando de 29,76 a 35,59 ciclos com máximo de coeficiente de variação de 1,94%.

As flutuações nos valores dos Cts nas diferentes corridas são devidas, possivelmente, às pequenas variações na quantidade do DNA utilizado em cada reação de PCR em Tempo Real. Ainda que essas flutuações pareçam ser um pouco altas, resultados similares foram observados por outros autores (FOTI et al, 2006; TAVENIERS et al, 2004). Ficou demonstrado que as medidas de Ct são bastante reproduzíveis com aparente robustez desse método. A Tabela 6 mostra os valores dos Cts, média, DP e CV (%) dos dois alvos.

**Tabela 6** – Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação dos alvos lectina e p35S em cada concentração do MRC

Alvo/concentração	Média Ct corrida 1	Média Ct corrida 2	Média Ct corrida 3	Média Ct corrida 4	Média Ct corrida 5	Média Ct	DP <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>
<b>lectina</b>								
MRC 0,1%	24,75	24,77	24,55	24,66	23,06	24,36	0,73	3,00
MRC 0,5%	24,97	24,77	24,93	24,57	22,79	24,41	0,92	3,75
MRC 1%	24,87	24,48	24,86	24,50	22,78	24,30	0,87	3,58
MRC 2%	24,88	24,85	24,74	24,56	22,78	24,36	0,89	3,67
MRC 5%	24,92	24,93	24,89	24,55	22,73	24,40	0,95	3,89
<b>p35S</b>								
MRC 0,1%	36,37	35,61	35,22	35,20	35,54	35,59	0,47	1,33
MRC 0,5%	34,26	33,14	32,84	32,67	33,02	33,19	0,63	1,89
MRC 1%	33,32	32,36	31,80	31,79	32,21	32,29	0,62	1,93
MRC 2%	32,23	31,33	30,98	30,85	31,13	31,30	0,55	1,75
MRC 5%	30,74	29,80	29,53	29,28	29,46	29,76	0,58	1,94

MRC= material de referência certificado

<sup>a</sup>DP= desvio padrão; <sup>b</sup>CV (%)= coeficiente de variação

Cada valor corresponde à média de 3 reações

#### 4.2.2.2 – Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de lectina e de p35S (precisão intercorridas)

A precisão também foi avaliada em 4 corridas independentes através da quantificação do MRC 5% diluído contendo de 88500 a 440 cópias de lectina e 4425 a 22 cópias de p35S (Tabela 7). Os coeficientes de variação (CV%) oscilaram entre 5,93 a 12,59 na amplificação da lectina e de 2,47 a 20% na amplificação da soja RR, sendo que as maiores variações foram encontradas na menor concentração (22 cópias). Resultados semelhantes foram encontrados por Cankar et al. (2006).

**Tabela 7** – Precisão da quantificação do MRC soja 5% através da estimativa do nº de cópias de lectina e p35S.

Alvo	Nº cópias DNA	Nº estimado de cópias				Média	DP <sup>a</sup>	CV % <sup>b</sup>
		1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	4ª corrida			
lectina	88500	85459	75024	83952	87604	83010	5531	6,7
	17700	16670	19713	17695	18966	18261	1349	7,4
	4400	4922	5180	4577	3837	4629	583	12,6
	880	1096	1021	1162	1037	1079	64	6,0
	440	348	341	338	403	357	31	8,6
p35S	4425	5030	3846	4670	4583	4532	497	11,0
	885	755	900	761	843	815	70	8,5
	221	214	214	211	203	210	5	2,5
	44	50	58	60	58	56	4	8,0
	22	24	18	15	18	18	3	20,0

<sup>a</sup>DP= desvio padrão; <sup>b</sup>CV (%)= coeficiente de variação  
Cada valor corresponde à média de 2 reações

#### 4.2.2.3 – Repetitividade (precisão intracorrída) e Exatidão na quantificação relativa de OGM

A precisão intracorrída foi avaliada através da verificação da repetitividade dos resultados obtidos da quantificação, em uma corrida, das 5 concentrações do MRC extraídos em 4 dias diferentes pelo método CTAB.

Os coeficientes de variação relativos (CV%) variaram de 12,7% a 24% e representam a repetitividade da análise completa incluindo a variabilidade relacionada à etapa de extração de DNA. A exatidão foi avaliada de acordo com o erro relativo calculado para cada concentração e variou de -2,4% a 10%, sendo maior na concentração mais baixa (0,1%), conforme dados da Tabela 8.

Nas análises de OGM, a precisão e exatidão são aceitáveis com valores de até 25% de coeficiente de variação (ENGL, 2008). Os resultados obtidos estão dentro desses limites e de acordo com os descritos em vários estudos (BERDAL e HOLSTEN-JENSEN, 2001; CANKAR et al., 2006; HUANG e PAN, 2005; KURIBARA, et al., 2002; TANI, 2005; TOYOTA et al, 2006; ŽEL et al. 2008), porém acima dos reportados por Terry e Harris (2001), Vařilingom et al. (1999) e Foti et al. (2006). Todos esses estudos foram realizados com outros iniciadores e sondas.

**Tabela 8 – Precisão e exatidão da quantificação do MRC soja RR**

MRC (%)	Ext.1	Ext.2	Ext. 3	Ext. 4	Média	DP <sup>a</sup>	CV % <sup>b</sup>	Erro relativo(%)
0,1	0,10	0,11	0,13	0,09	0,11	0,017	15,4	10
0,5	0,60	0,56	0,39	0,37	0,48	0,117	24	-4
1	1,20	0,76	0,84	1,09	0,97	0,207	21	-3
2	1,95	1,56	1,93	2,13	1,89	0,240	12,7	-5,5
5	4,19	5,76	4,85	4,75	4,88	0,650	13,3	-2,4

MRC= material de referência certificado

<sup>a</sup>DP= desvio padrão; <sup>b</sup>CV (%)= coeficiente de variação

Cada valor corresponde à média de 3 reações

#### 4.2.3 - Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ) absolutos e relativos

Existem três maneiras de se expressar os limites de detecção e quantificação na análise de OGM, apesar de que todos se referem à menor quantidade de alvo que pode ser detectado e quantificado com confiabilidade. O limite absoluto é o menor número inicial de cópias que pode ser detectado e quantificado com confiabilidade. O limite relativo se refere ao menor percentual de OGM relativo à espécie (ex: soja) e o limite prático é o limite na amostra em análise (BERDAL e HOLSTEN-JENSEN, 2001; YANG et al, 2005b).

Os limites de detecção e quantificação absolutos e relativos foram estimados através de diluições sucessivas de DNA extraído do MRC 5% correspondendo a aproximadamente 4425 (5%), 885 (1%), 221 (0.25%), 44 (0.05%), 22 (0.025%), 11 (0.0125%) e 5.5 (0.00625%) cópias de p35S por 25 µL de reação de PCR em tempo real.

O alvo p35S foi detectado em todas as triplicatas até o número de 11 cópias com um Ct médio de 39,36 e, portanto, o LOD foi estimado como sendo 10 cópias correspondendo ao LOD relativo de 0,0125%.

O LOQ foi estimado como sendo 40 cópias (0,05%) uma vez que o desvio padrão dos Cts encontrados entre as 12 réplicas foi de 0,600, valor que foi considerado aceitável para esse tipo de quantificação (Tabela 9). Este mesmo valor de 40 cópias já havia sido estimado nos ensaios de reprodutibilidade na quantificação do número de cópias.

Este limite está um pouco acima do limite experimentalmente determinado por Berdal e Holsten-Jensen (2001) de 30 cópias, por Terry & Harris (2001) de 20 cópias e Foti e col. (2006) de 30 cópias que utilizaram outros iniciadores para quantificação.

**Tabela 9** - Dados obtidos na amplificação de diluições seriadas do MRC soja 5% utilizados para determinação do LOD e LOQ

	Cópias de p35S por reação ( % p35S por reação)						
	4425 (5%)	885 (1%)	221 (0,25%)	44 (0,05%)	22 (0,025%)	11 (0,0125%)	5,5 (0,00625%)
<b>Nº positivos/total</b>	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	6/12
<b>Ct médio dos positivos</b>	30.88	33.29	35.49	38.04	38.90	39.36	-
<b>Desvio padrão dos Ct</b>	0.241	0.269	0.397	0.600	0.768	0.714	-

#### 4.3 - Quantificação de amostras de alimentos utilizando o “TaqMan® GMO 35S Soy Detection kit”

Os dados desta avaliação foram publicados por Branquinho, Ferreira e Cardarelli-Leite (2010).

As análises de quantificação de soja geneticamente modificada em produtos alimentícios comercializados em várias cidades do país foram provenientes dos programas de monitoramento realizados por autoridades sanitárias estaduais ou municipais, entre 2004 e 2008.

As amostras foram quantificadas utilizando-se o reatente “TaqMan® GMO 35S Soy Detection kit” e os resultados expressos em termos de conteúdo de OGM menor ou maior do que 1%, conforme apresentado na Tabela 10. Todas as curvas de calibração com os MRC de soja RR® se apresentaram dentro dos parâmetros de linearidade, inclinação e eficiência segundo os critérios do ENGL (2008). Os resultados das análises das amostras foram considerados válidos quando o coeficiente de variação entre as réplicas das amostras foi de até 25% e a quantificação do MRC 1% (controle interno da qualidade) ficou entre os limites inferior (LIA) e superior de alerta (LSA), correspondentes a  $\pm 2$  desvios padrão, calculados pelo Gráfico de Shewhart.



**Tabela 10** – Quantificação de amostras de alimentos utilizando o “TaqMan® GMO 35S Soy Detection kit”

<b>Produtos alimentícios</b>	<b>Nº de amostras analisadas</b>	<b>Nº de amostras com teor &lt;1%</b>	<b>Nº de amostras com teor &gt;1%</b>
Grãos de soja	12	5	7
Extrato de soja	6	6	0
Bebidas a base de soja	5	5	0
Fórmulas infantis	7	6	1
Farinhas de soja	3	1	2
Farelo de soja	7	0	7
Fibra de soja	2	2	0
Proteína texturizada de soja, proteína de soja	8	5	3
Sopa desidratada	6	2	4
Produtos cárneos	7	7	0
“Carnes” vegetais	4	4	0
Ração para animais	1	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>68</b>	<b>43 (63,2%)</b>	<b>25 (36,8%)</b>

Dentre as 68 amostras analisadas, 43 amostras (63,2%) apresentaram conteúdo de OGM menor do que 1% e 25 amostras (36,8%) conteúdo maior do que 1%. Esses resultados são similares aos encontrados por Greiner e Konietzny (2008) que observaram um aumento na presença de soja RR acima de 1% em produtos alimentícios de 11% em 2000 a 36% em 2005 e também por Marcelino, Guimarães e Barros (2007) que ao quantificarem 1530 amostras de alimentos de várias matrizes, encontraram 46,01% com conteúdo acima de 1%.

Entre as amostras com conteúdo de OGM maior do que 1%, 1 amostra de fórmula infantil apresentou 3% de OGM e 7 amostras de grãos de soja, 3 amostras de TPS, 7 amostras de farelos de soja e 1 amostra de ração animal apresentaram conteúdo acima de 5%. Em relação às amostras de sopas desidratadas, 1 amostra apresentou 2,5% e 3 amostras estavam acima de 5%. Esta superestimativa pode ser explicada pelo fato de que esses produtos contém ingredientes provenientes de plantas da família das crucíferas que podem estar infectados com vírus CaMV (KOK et al., 2002). Sendo assim, esses resultados deveriam ser confirmados através de ensaios de quantificação cujo alvo seja outro elemento genético diferente do promotor 35S. O conteúdo de OGM das outras amostras analisadas ficou entre 0,05 e 1% de soja RR.

Nenhuma das amostras que continha soja RR acima do limite de 1%, coletada nos mercados e nas indústrias, estava apropriadamente rotulada como requer a legislação brasileira. Esta mesma situação foi observada nos estudos realizados por Brod e Arisi (2008), Greiner e Konietzny (2008) e Ferreira, Branquinho e Cardarelli-Leite (2009).

Os resultados da PCR demonstraram que a presença de soja RR em um largo espectro de produtos alimentícios e, apesar do número de amostras analisadas, a detecção de OGM acima de 1% em 36% dos produtos demonstraram que muitas indústrias brasileiras ainda não estão cumprindo a legislação brasileira de rotulagem, observando os direitos do consumidor. Esta situação demonstra a necessidade de contínuos programas de monitoramento a serem conduzidos pelas autoridades de saúde.

Nas análises de verificação do cumprimento da legislação da rotulagem de produtos alimentícios, cabe aos laboratórios determinarem a variação dos métodos de análise para poderem declarar, com confiabilidade estatística, se o produto se encontra ou não em conformidade com a legislação. Esta variação deve ser estimada em termos da incerteza de medição a partir de dados de reprodutibilidade e precisão de análises independentes, realizadas no laboratório, ou a partir de resultados de estudos colaborativos, conforme especificações do documento elaborado pelo "Joint Research Centre" (Trapmann et al., 2009) que apresenta os dados dos estudos colaborativos de quantificação de vários eventos para determinação dos LOD, LOQ e a incerteza expandida no limite da legislação europeia (0,9%). No caso da soja RR, através desses estudos foi estimada uma incerteza expandida de 0.53%.

A variabilidade total das análises de vários eventos por PCR em tempo real utilizando métodos de diferentes níveis de especificidade foi estimada por Scholtens et al. (2010) através do estudo da contribuição dos fatores relativos à variação entre as corridas em diferentes dias, da variação dos métodos de extração de DNA e da variação do PCR em uma mesma corrida. Essas variáveis foram quantificadas por programas estatísticos e foram calculados o desvio de reprodutibilidade, o desvio de repetitividade das análises de vários eventos por diferentes métodos e os limites de decisão, em função desses parâmetros, para declaração de não conformidade com a legislação europeia (acima de 0,9%). Em relação à quantificação de soja RR o limite de decisão para o método construção-específico/lectina estimado foi de 1,59%, para o método de triagem p35S/lectina o limite foi de 1,47% e o t-nos/lectina foi de 2,41%.

Esses resultados demonstram claramente a necessidade da determinação da variabilidade dos métodos de análise por PCR em tempo real por ocasião da validação dos métodos (validação *in-house*) e da implantação dos cálculos da incerteza da medição pelos laboratórios, principalmente aqueles que realizam análises de caráter oficial (análise fiscal), para a emissão de resultados cada vez mais confiáveis.

#### **4.4 – Desenvolvimento do método de quantificação de soja RR<sup>®</sup> cujo alvo é a região de integração do promotor 35S e o genoma da planta (quantificação evento específica)**

##### **4.4.1 - Seleção dos iniciadores e sondas para os alvos lectina e soja RR**

O programa Primer Express<sup>®</sup> forneceu várias possibilidades de conjuntos de iniciadores e sondas tanto para amplificação do alvo lectina como para o alvo RR, cujo produto de amplificação estava em torno de 100 pb, tendo sido selecionados os conjuntos que apresentaram menores pontuações (“penalty”). Antes de serem testados *in vitro* esses iniciadores foram checados quanto à formação de grampos e de dímeros pelo programa Primer Express, tendo sido escolhidos os que apresentaram menor formação de estruturas secundárias e de dímeros de iniciadores. Também foi utilizado o programa “Bioedit Sequence Alignment Editor” para verificação da formação de possíveis alinhamentos entre os iniciadores e as sondas, não tendo sido observado pareamento significativo (mais de 4 bases seguidas e nas extremidades) entre eles. Também foram submetidos à análise pelo programa de alinhamento de sequências BLAST (NCBI - Basic Local Alignment Search Tool) tendo sido encontrada 100% de identidade com DNA do gene *lectin (Le1)* de *Glycine max* (soja) e DNA do transgene de soja Roundup Ready / Construção sintética do E35S-junção da planta.

Todas as sondas para o alvo RR foram marcadas na posição 5’ com FAM e na posição 3’ com uma molécula *quencher* não fluorescente - MGBNFQ. As sondas para o alvo lectina foram marcadas na posição 5’ com VIC e na posição 3’ com uma molécula MGBNFQ. Somente a sonda Lec1629 foi marcada na posição 3’ com TAMRA.

#### 4.4.1.1 - Seleção dos iniciadores e sondas para o alvo lectina

O gene da lectina de soja é constituído de 2162 pb e possui a seguinte sequência:

```
1 CAATGCCATCGTATCGTGTGTCACAATGGAATACAGCAATGAACAAATGCTATCCTCTTGAG
61 AAAAGTGAAATGCAGCAGCA GCAGCAGACT AGAGTGCTAC AAATGCTTAT CCTCTTGAGA
121 AAAGTGAAATGCAGCGGCAG CAGACCTGAG TGCTATATAC AATTAGACAC AGGGTCTATT
181 AATTGAAATT GTCTTATTAT TAAATATTTT GTTTTATATT AATTTTTTAA ATTTTAATTA
241 AATTTATATA TATTATATTT AAGACAGATA TATTTATTTG TGATTATAAA TGTGTCACTT
301 TTTCTTTTAG TCCATGTATT CTTCTATTTT TTCAATTTAA CTTTTTATTT TTATTTTTAA
361 GTCACCTCTGA TCAAGAAAAC ATTGTTGACA TAAAACCTATT AACATAAAAT TATGTTAACA
421 TGTGATAACA TCATATTTTA CTAATATAAC GTCGCATTTT AACGTTTTTT TAACAAATAT
481 CGACTGTAAG AGTAAAAATG AAATGTTTGA AAAGGTTAAT TGCATACTAA CTATTTTTTTT
541 TCCTATAAGT AATCTTTTTT GGGATCANNT GTATATCATT GAGATACGAT ATTAATATAG
601 GGTACCTTTT CACAAAACCT ACCCTTGTTA GTCAAACCAC ACATAAGAGA GGATGGATTT
661 AAACCAGTCA GCACCGTAAG TATATAGTGA AGAAGGCTGA TAACACACTC TATTATTGTT
721 AGTACGTACG TATTTCCCTT TTTGTTTGTG TTTTGAATTT AATTAATTA AATATATATG
781 CTAACAACAT TAAATTTTAA ATTTACGTCT AATTATATAT TGTGATGTAT AATAAATTGT
841 CAACCTTTAA AAATTATAAA AGAAATATTA ATTTTGATAA ACAACTTTTTG AAAAGTACCC
901 AATAATGCTA GTATAAATAG GGGCATGACT CCCCATGCAT CACAGTGCAA TTAGCTGAA
961 GCAAAGCAAT GGCTACTTCA AAGTTGAAAA CCCAGAATGT GGTTGTATCT CTCTCCCTAA
1021 CCTAACCTT GGTACTGGTG CTAAGGCAAC GCAAGGCAA CTCAGCGGAA ACTGTTTTCTT
1081 TCAGCTGGAA CAAGTTCGTG CCGAAGCAAC CAAACATGAT CCTCCAAGGA GACGCTATTG
1141 TGACCTCCTC GGGAAAGTTA CAACTCAATA AGGTTGACGA AAACGGCACC CCAAACCTT
1201 CGTCTCTTGGTGCAGCCCTCTACTCCACCCCATCCACATTTGGGACAAAGAAACCGGTA
1261 GCGTTGCCAGCTTCGCCGCTTCTTCAACTTCACCTTCTATGCCCTGACACAAAAAGGC
1321 TTGCAGATGGGCTTGCCCTTCTTCTCGCACCAATTGACACTAAGCCACAAACACATGCAG
1381 GTTATCTTGG TCTTTTCAAC GAAAACGAGT CTGGTGATCA AGTCGTGCT GTTGAGTTTG
1441 AACTTTCCG GAACTCTTGG GATCCACCAA ATCCACACAT CGGAATTAAC GTCAATTCTA
1501 TCAGATCCAT CAAAACGACG TCTTGGGATT TGGCCAACAA TAAAGTAGCC AAGGTTCTCA
1561 TTACCTATGA TGCCTCCACC AGCCTCTTGG TTGCTTCTTT GGTCTACCCT TCACAGAGAA
1621 CCAGCAATAT CCTCTCCGAT GTGGTTCGATT TGAAGACTTC TCTTCCCAG TGGGTGAGGA
1681 TAGGGTTCTC TGCTGCCACG GGAATCGACA TACCTGGGGA ATCGCATGAC GTGCTTTCTT
1741 GGTCTTTTGC TTCCAATTTG CCACACGCTA GCAGTAACAT TGATCCTTTG GATCTTACAA
1801 GCTTTGTGTT GCATGAGGCC ATCTAAATGT GACAGATCGA AGGAAGAAAG TGTAATAAGA
1861 CGACTCTCAC TACTCGATCG CTAGTGATTG TCATTGTTAT ATATAAAT GTTATCTTTC
1921 ACAACTTATC GTAATGCATT GTGAACTAT AACACATTTA ATCCTACTTG TCATATGATA
1981 AACTCTCCC CATTAAAAC TCTTGTCAT TAAAGATAT AAGATTCTTT AAATGATTAA
2041 AAAAAATATA TTATAAATTC AATCACTCCT ACTAATAAAT TATTAATTA TATTTATTGA
2101 TAAAAAAAT ACTTATACTA ATTAGTCTG AATAGAATAA TTAGATTCTA GA
```

Foram selecionadas e sintetizadas as seguintes sequências de iniciadores e de sondas:

MlecF: 1636 5' CCGATGTGGTTCGATTTGAAG 3' 1655

MlecR: 1769 5' AGCGTGTGGCAAATTGGA 3' 1752

fragmento: 134pb

Sonda Lec1: 1688 5' VIC CTCTGCTGCCACGGGACTCG MGBNFQ 3' 20pb

Lec- F 1722: 1722 5' TCGCATGACGTGCTTTCTTG 3' 1741

Lec- R 1822: 1822 5' ATGGCCTCATGCAACACAAA 3' 1803

fragmento: 101pb

Lec-F1205: 1205 5' TCTTGGTCGCGCCCTCTAC 3' 1223

Lec-R1334: 1334 5'AAGCCCATCTGCAAGCCTTT 3' 1315

fragmento: 130 pb

Lec-F1663: 1663 5' TTCCCGAGTGGGTGAGGATA 3' 1682

Lec-R1773: 1773 5'TGCTAGCGTGTGGCAAATTG 3' 1754

fragmento: 111pb

Sonda Lec 1720: 5'VIC AATCGCATGACGTGCTT MGBNFQ 3' 17pb

Lec-F 1218: 1218 5' CTCTACTCCACCCCATCCA 3' 1237

Lec-R 1332: 1332 5' GCCCATCTGCAAGCCTTTTT 3' 1313

fragmento: 115pb

Sonda Lec 1269: 5'VIC AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC TAMRA 3' 26pb

Moriuchi et al. (2007) utilizaram uma sonda, marcada com TAMRA, com a mesma sequência de bases na avaliação do PCR quantitativo em alimentos processados.

#### 4.4.1.2 - Seleção dos iniciadores e sondas para o alvo soja RR

Essa sequência alvo é composta por 390 pares de bases e tem a seguinte constituição, sendo que os nucleotídeos de 1 a 209 (em maiúsculas) estão localizados na região do inserto p35S e os nucleotídeos seguintes estão localizados na região da planta (WINDELS et al., 2001):

```
1 GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCCTTACGTCAGTGGAGATATCACATCAATCCACTTGCT 60
61TTGAAGACGTGGTTGGAACGTCTTCTTTTTCCACGTGCTCCTCGTGGGTGGGGTCCATC 120
121TTTGGGACCACTGTCGGCAGAGGCATCTTCAACGATGGCCTTTCCTTTATCGCAATGATG 180
181GCATTTGTAGGAGCCACCTTCTTTTCCAAttgggtccctatgttatttaacctgta 240
241 tgtatgatcttatttgaatgaaatgcaataagttatttctagtaaaaaaaaaataaacat 300
301 ttgatagaacaaattaaagcatgcaaaaataactcattagcatcggttaaattgaaggg 360
361 tttgaataattgcacaaggttctgaattc 390
```

Foram selecionadas e sintetizadas as seguintes sequências de iniciadores e de sondas:

MRR-F: 58 5'GCTTTGAAGACGTGGTTGGA 3' 77

MRR-R: 166 5' AGGAAAGGCCATCGTTGAAG 3' 147

fragmento: 109 pb

Sonda RR 92: 92 5' VIC CACGTGCTCCTCGTGG MGBNFQ 3' 16 pb

RR-F: 130 5'ACTGTCCGGCAGAGGCATCTT 3' 149

RR-R: 220 5' GGGAACCCAAATGGAAAAGG 3' 201

fragmento: 91 pb

RR-F61: 61 5' TTGAAGACGTGGTTGGAACGT 3'

RR-R208: 208 5' GGAAAAGGAAGGTGGCTCCTA 3'

fragmento: 148pb

RR-F53: 53 5' CACTTGCTTTGAAGACGTGGTT 3'

RR-R184: 184 5' ATGCCATCATTGCGATAAAGG 3'

fragmento: 132pb

RR-F68: 68 5' CGTGGTTGGAACGTCTTCTTTT 3'

RR-R203: 203 5' AGGAAGGTGGCTCCTACAAATG 3'

fragmento: 136pb

RR-F147: 147 5' CTTCAACGATGGCCTTTCCTT 3'

RR-R 227: 227 5' AAACATAGGGAACCCAAATGGA 3'

Sonda RR 182: FAM 5' CATTTGTAGGAGCCACCTT MGBNFQ 3' 19pb

Fragmento: 81pb

RR-F146: 146 5' TCTTCAACGATGGCCTTTCCT

RR-R 236: 236 5' GGTTAAAATAAACATAGGGAACCCAAA 3'

Fragmento: 91pb

Sonda RR 188: FAM 5' TAGGAGCCACCTTCCT MGBNFQ 3' 16pb

#### **4.5 – Avaliação da especificidade e sensibilidade por PCR qualitativo, PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green e pelo sistema TaqMan dos iniciadores para o alvo RR**

Especificidade de um método é definida como a habilidade do método em detectar uma substância ou uma classe de substâncias sem interferência de outros componentes presentes na amostra e de identificar o analito sem ambiguidade. Assim, um método específico produz resultados corretos para um analito em particular, enquanto outros analitos possam interferir um com outro. Métodos de PCR quantitativo para análise de alimentos GM devem ser altamente específicos (HUBNER, 2001). Um método específico não deve produzir sinais de amplificação com sequências alvo diferentes dos alvos para os quais o método foi desenvolvido. Isto deve ser demonstrado por análises de similaridade através de banco de dados e de resultados experimentais obtidos com materiais transgênicos. Na detecção de eventos geneticamente modificados, o alvo deve ser evento específico (ENGL, 2008).

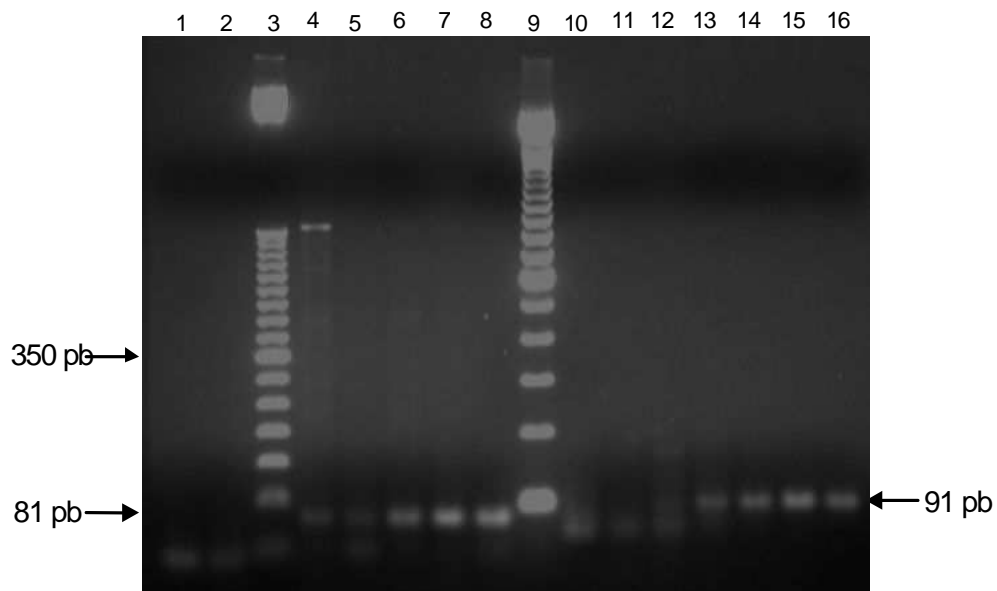
##### **4.5.1 - Avaliação da especificidade por PCR qualitativo**

Os iniciadores listados no item 4.4.1.2 foram testados com os DNA extraídos dos MRC de soja RR, com os DNA dos vegetais GM e com amostras de alimentos contendo várias concentrações de soja RR listados no item 3.7.2.1. Para aumentar a probabilidade de se encontrar um conjunto que fosse bastante específico e com alta sensibilidade, foram também testados por PCR e visualizados em gel de agarose os produtos de amplificação obtidos com os conjuntos de iniciadores de direção (5'-3') e reverso (3'-5') formados entre as opções fornecidas pelo programa, totalizando assim dez (10) opções de conjuntos.

Os pares de iniciadores MRR-F 58/RR-R 208 (151pb) e MRR-F 58/MRR-R 166 (109pb) foram descartados porque a PCR com os MRC apresentou uma banda com aproximadamente 500 pb e 200 pb, respectivamente, indicando amplificação em outra região do genoma da soja. A PCR com os iniciadores RR-F 61/RR-R 208 (148 pb), RR-F 68/RR-R 208 (141 pb) e RR-F 68/RR-R 203 (136pb) demonstrou amplificação com DNA extraído do feijão geneticamente modificado. O par de iniciadores RR-F 53/RR-R 184 (132 pb) amplificou somente duas amostras de alimentos processados.

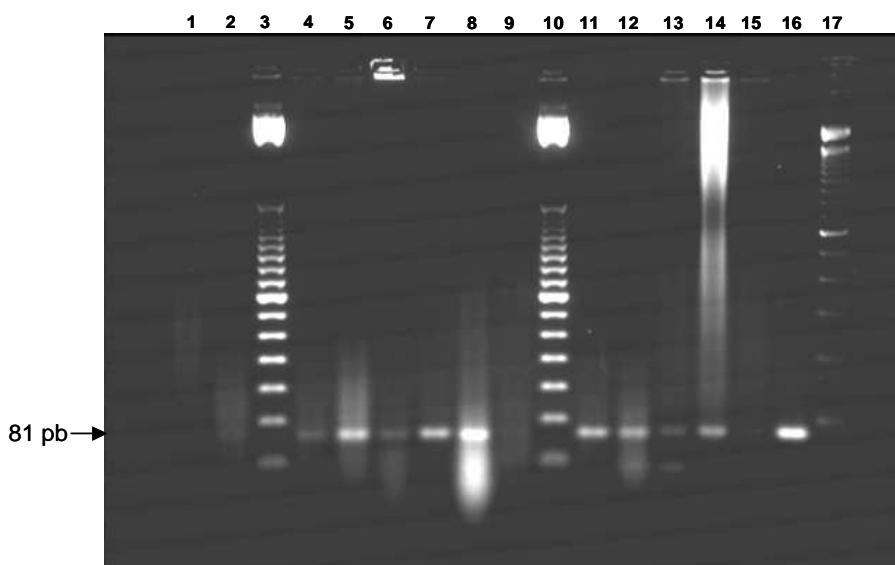
Já os pares de iniciadores RR-F 68/RR-R 220 (153pb), MRR-F 58/RR-R 220 (163 pb), RR-F 146/RR-R 236 (91 pb) e RR-F 147/RR-R 227 (81 pb) foram os que

melhor amplificaram com o MRC de soja RR nas várias concentrações, não amplificaram com outros vegetais GM e que amplificaram com as amostras de alimentos (Tabela 11). A Figura 8 mostra o gel de agarose da amplificação do MRC de soja RR com os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 e RR-F 146/RR-R 236 e a Figura 9 mostra o gel de agarose da amplificação de várias amostras de alimentos contendo soja RR em diferentes concentrações, com os iniciadores RR-F 147/RR-R 227.



**Figura 8** - Gel de agarose a 2% da amplificação do MRC soja RR (pistas 4-8 iniciadores RR-F147/RR-R227 e pistas 10-16 iniciadores RR-F146/RR-R236).

Pista 3: PM 50pb Gibco-BRL; pista 9: PM 100pb; pista 1: CRM, pista 2: MRC soja RR 0%; pistas 4 a 8: MRC soja RR 0,1% a 5%, pistas 11 a 17: MRC soja RR 0% a 5%



**Figura 9** - Gel de agarose a 2% da amplificação do alvo RR (pistas 4-9 e 11-16) nas amostras de alimentos com os iniciadores RR-F147/RR-R227.



Pistas 3 e 10: PM 50pb Gibco-BRL; pista 17: PM 100pb Gibco-BRL; pista 1: CRM, pista 2: MRC soja RR 0%; pista 4 e 5: MRC soja RR 0.1% e 1%; pista 6: soja em grão (0,62%); pista 7: soja em grão (>5%); pista 8: bebida a base de soja (0,25%); pista 9: bebida a base de soja (0,01%); pista 11: PTS (0,75%); pista 12: PTS (>5%); pista 13: farinha de soja (0,09%); pista 14: sopa desidratada (2,54%); pista 15: sopa desidratada (0,4%); pista 16: carne de soja (0,58%).

**Tabela 11** – PCR qualitativo com os diferentes iniciadores do alvo soja RR.

Pares de iniciadores estudados	Aparecimento de fragmento inesperado	Amplificação do DNA de feijão GM	Amplificação do DNA de alimentos
MRR-F58/RR-R208 (151pb)	+	NR	NR
MRR-F58/MRR-R166 (109 pb)	+	NR	NR
RR-F61/RR-R208 (148 pb)	-	+	NR
RR-F68/RR-R208 (141 pb)	-	+	NR
RR-F68/RR-R203 (136 pb)	-	+	NR
RR-F53/RR-R184 (132 pb)	-	NR	-
RR-F68/RR-R220 (153 pb)	-	-	+
MRR-F58/RR-R220 (163 pb)	-	-	+
RR-F146/RR-R236 (91 pb)	-	-	+
RR-F147/RR-R227 (81 pb)	-	-	+

NR= não realizado      + = positivo      - = negativo

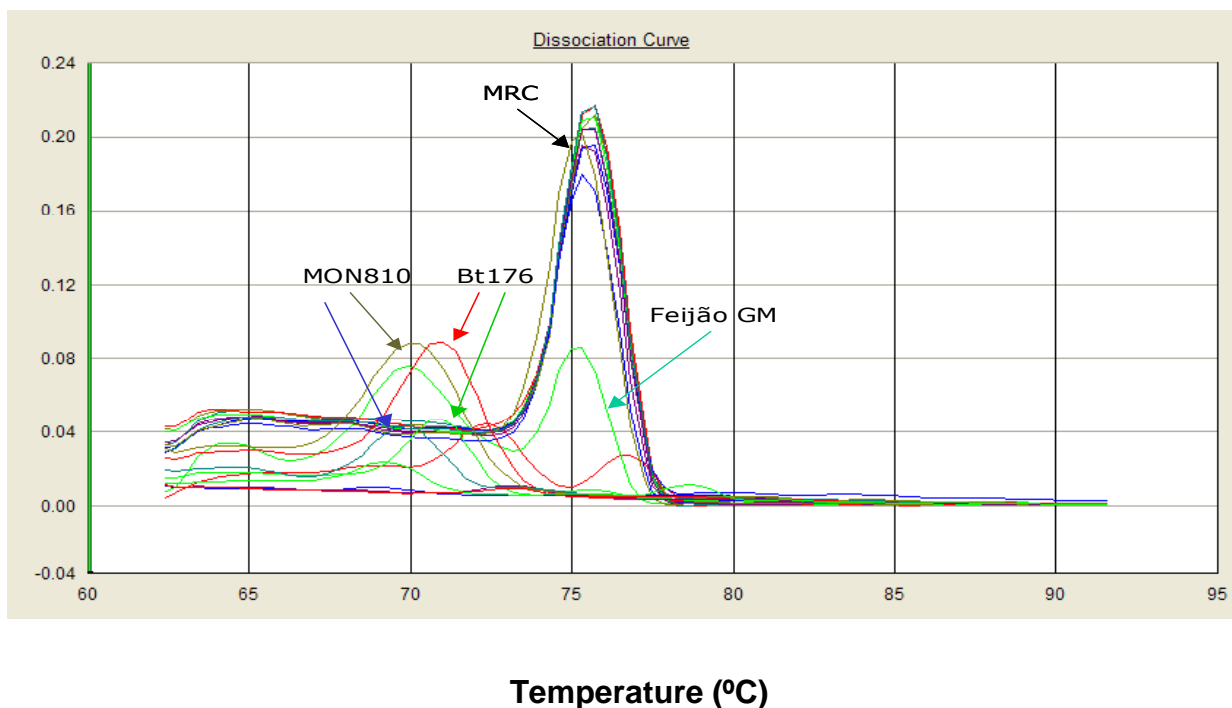
#### 4.5.2 - Avaliação dos iniciadores por PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green

O objetivo da análise da curva de dissociação é o de determinar a temperatura de dissociação ( $T_m$ ) da sequência de ácido nucléico amplificada em uma amostra desconhecida para se detectar possíveis produtos inespecíficos, uma vez que a  $T_m$  é dependente do tamanho e da sequência do produto de amplificação formado, e também o de realizar a otimização da concentração dos iniciadores. Durante os ciclos da curva de dissociação o equipamento determina a diminuição da fluorescência do corante SYBR Green resultante da dissociação da dupla fita de DNA formada na reação de PCR.

Os DNAs extraídos dos MRC contendo diferentes concentrações de soja e vegetais geneticamente modificados foram amplificados pelo sistema SYBR Green com os iniciadores RR-F 68/RR-R 220, MRR-F 58/RR-R 220, RR-F 146/RR-R 236 e RR-F 147/RR-R 227. Esses iniciadores amplificaram as diferentes concentrações do MRC entre os Cts médios de 27 (MRC 5%) e 34 (MRC 0,1%) e as curvas de dissociação demonstraram produtos de amplificação de temperaturas de dissociação ( $T_m$ ) de 81°C, 81°C, 75,7°C e 75,5°C, respectivamente.

As reações com os DNAs extraídos dos milhos Bt 176, Bt 11 e MON 810 apresentaram amplificação com os iniciadores RR-F 68/RR-R 220 e MRR-F 58/RR-R 220 entre os Cts 35 e 36 sendo que nas curvas de dissociação as Tm dos produtos de amplificação ficaram em torno de 70°C, demonstrando que os produtos amplificados são diferentes dos resultantes da amplificação com a soja RR. Como as sequências desses iniciadores estão localizadas na região do inserto p35S e esses eventos de milho são constituídos pelo promotor p35S do CaMV, pode estar ocorrendo pareamento dos iniciadores com consequente amplificação. Isto não ocorreu com o milho GA 21 que não possui esse promotor na sua construção. Já as reações com o DNA do feijão geneticamente modificado apresentaram amplificação com os iniciadores RR-F 68/RR-R 220 e MRR-F 58/RR-R 220 e nas curvas de dissociação as Tm ficaram em torno de 81°C demonstrando que esses produtos de amplificação são bem semelhantes aos da amplificação com a soja RR.

As reações dos DNAs extraídos dos milhos Bt 176, Bt 11 e MON 810 com os iniciadores RR-F 146 / RR-R 236 e RR-F 147/RR-R 227 apresentaram amplificação próxima ao Ct 39, sendo que nas curvas de dissociação as Tm dos produtos de amplificação ficaram em torno de 70°C, demonstrando que os produtos amplificados também são diferentes daqueles resultantes da amplificação com a soja RR. Estas amplificações também podem ser resultado da formação de DNA de dupla fita entre os iniciadores, uma vez que não foi realizada a otimização de suas concentrações o que pode ter levado a um excesso de iniciadores. Não houve amplificação com DNA do milho GA 21. Já as reações com o DNA do feijão geneticamente modificado resultaram em produtos de amplificação com Tm 75,5°C, bem semelhantes aos da amplificação com a soja RR. A curva de dissociação está apresentada na Figura 10. O resumo dos ensaios está demonstrado na Tabela 12.



**Figura 10** - Curva de Dissociação do MRC soja RR, milho Bt 176, Bt11, MON810, GA21 e feijão GM após PCR em tempo real com os iniciadores RR-F147/RR-R 227

**Tabela 12** – PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green com os diferentes iniciadores do alvo soja RR

Pares de iniciadores estudados	Ct da amplificação / Tm			
	MRC 5%	Bt 176, Bt 11 e MON 810	GA 21	Feijão GM
RR-F68/RR-R220 (153 pb)	27 / 81°C	36 / 70°C	-	38 / 81°C
MRR-F58/RR-R220 (163 pb)	27 / 81°C	36 / 70°C	-	38 / 81°C
RR-F146/RR-R236 (91 pb)	27 / 75,7°C	39 / 70°C	-	38 / 75,5°C
RR-F147/RR-R227 (81 pb)	27 / 75,5°C	39 / 70°C	-	38 / 75,5°C

#### 4.5.3 - Avaliação da especificidade dos iniciadores por PCR em tempo real pelo sistema TaqMan

Foram realizadas reações de amplificação dos DNAs extraídos dos MRC de várias concentrações, dos milhos e feijão geneticamente modificados com os seguintes iniciadores e sondas:

- RR-F 68/RR-R 220 e sonda RR92
- MRR-F 58/RR-R 220 e sonda RR92
- RR-F 147/RR-R 227 e sonda RR 182
- RR-F 147/RR-R 227 e sonda RR 188
- RR-F 146/RR-R 236 e sonda RR 182

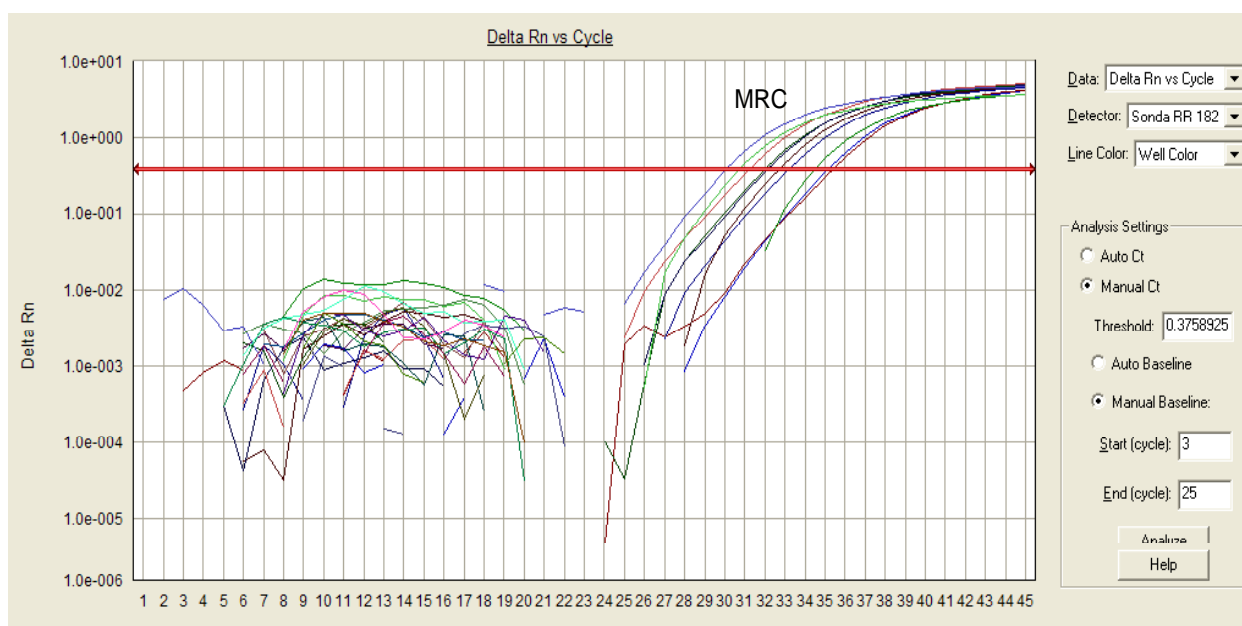
As diferentes concentrações de soja RR do MRC amplificaram com os iniciadores RR-F 68/RR-R 220 e MRR-F 58/RR-R 220 e com a sonda RR92 entre os Cts 35 (5%) e 40 (0,1%), indicando baixa sensibilidade do sistema na amplificação de concentrações menores de soja RR. As reações com as soluções de DNA dos milhos foram todas negativas. Entretanto, as reações com as amostras de feijão geneticamente modificado foram positivas próximas ao Ct 44, confirmando que esses iniciadores amplificam na presença desse vegetal transgênico.

Os iniciadores RR-F 146/RR-R 236 e sonda RR 182 amplificaram os MRC entre os Cts 34 (5%) e 38 (0,1%). Já os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 com a sonda RR 188 e com a sonda RR 182 amplificaram as soluções de DNA do MRC entre os Ct de 29 (5%) e o Ct 34 (0,1%), compatíveis com a amplificação desses MRC com o kit 35S. As reações com os milhos e feijão geneticamente modificado foram todas negativas, confirmando a maior especificidade desses iniciadores.

Também foram realizadas reações de PCR em tempo real com os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 e amostras de extrato de soja, PTS, hambúrguer de carne bovina e frango, farinha de soja e grão de soja não GM que não haviam amplificado com o kit 35S em análises anteriores. Todas as amostras também não apresentaram amplificação até o Ct 45, confirmando a especificidade desses iniciadores.

Um outro aspecto que deve ser observado nas curvas de amplificação é o valor de  $\Delta Rn$  que corresponde à intensidade de emissão de fluorescência do corante *reporter* normalizada com a intensidade de emissão de fluorescência da referência passiva. Quanto maior o  $\Delta Rn$  é indicativo de maior eficiência da reação da PCR em tempo real. Na amplificação da maior concentração do MRC (5%) com o kit 35S obteve-se um  $\Delta Rn$  em torno de 5,0. Nas reações de amplificação do MRC 5% com os vários iniciadores e sondas, a maior  $\Delta Rn$  obtida foi de 7,9 com os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 e sonda RR 182, o que indica uma maior eficiência desses iniciadores na amplificação da soja RR.

Estes resultados sugerem que o sistema de PCR desenvolvido para se detectar sequências de soja RR utilizando os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 e sonda RR 182 demonstram especificidade e sensibilidade suficientes para uso em análises qualitativas e quantitativas. Na Tabela 13 estão apresentados o resumo dos ensaios e a Figura 11 mostra a curva de amplificação com os MRC.



**Figura 11** - Curva de amplificação do MRC soja RR (0,1, 0,5,1,2 e 5%) pelo sistema TaqMan com os iniciadores RR-F 147/FF-R 227 e sonda RR 182.

**Tabela 13** – PCR em tempo real pelo sistema TaqMan com os diferentes iniciadores do alvo soja RR

Pares de iniciadores e sondas* estudados	Materiais quantificados		
	MRC 5%	MRC 0,1%	Milhos e Feijão GM
RR-F68/RR-R220 + RR92*	+ (Ct 35)	+ (Ct 40)	- ; + (feijão GM)
MRR-F58/RR-R220 + RR92*	+ (Ct 35)	+ (Ct 40)	- ; + (feijão GM)
RR-F147/RR-R227 + RR182*	+ (Ct 29)	+ (Ct 34)	-
RR-F147/RR-R227 + RR188*	+ (Ct 29)	+ (Ct 34)	-
RR-F146/RR-R236 + RR182*	+ (Ct 34)	+ (Ct 38)	-

#### 4.5.4 - Avaliação da sensibilidade com amostras de alimentos contendo diferentes teores de soja RR®

Foi realizada uma análise comparativa entre os Cts obtidos na quantificação das amostras de alimentos utilizando o TaqMan® GMO 35SSoy Detection Kit e os Cts obtidos com os iniciadores RR-R 147/RR-R 227 e com a sonda RR 182. Foram testadas amostras de alimentos de diferentes níveis de processamento contendo diferentes teores de soja RR. Os resultados dos Cts, conforme demonstrado na Tabela 14, foram bem semelhantes nos dois sistemas de quantificação, demonstrando que os iniciadores RR-R 147/RR-R 227 e a sonda RR 182 são de grande sensibilidade, sendo capazes de amplificar as amostras

de alimentos de várias matrizes contendo concentrações variáveis de soja RR (0,06% a >5%). Esses resultados demonstram que esses iniciadores podem ser utilizados na quantificação do teor de OGM em diversas matrizes de alimentos processados.

**Tabela 14** - Comparação dos Cts na amplificação do alvo RR utilizando-se o kit 35S e os iniciadores RR-R 147/RR-R 247 com a sonda RR 182.

<b>Amostra de alimento (conc. OGM)</b>	<b>Ct do alvo RR RR-F 147/RR-R 227 sonda 182</b>	<b>Ct do alvo 35S com TaqMan® 35S Soy Detection kit</b>
1783/06 – Grão de soja (0,62%)	35,33 ± 0,23	36,4
3145/06 – Bebida a base de soja com frutas (0,01%)	35,86 ± 0,48	37,4
2442/07 – TPS (0,75%)	32,62 ± 1,09	34,5
482/08 – TPS (>5%)	25,92 ± 1,02	26,64
1761/06 – Carne vegetal (0,06%)	39,11 ± 1,54	39,52
2229/08 – Sopa desidratada (0,4%)	38,81 ± 0,34	38,24
3870/07 – Sopa desidratada (2,54%)	37,04 ± 0,65	37,05
1284/03 – Fórmula infantil (0,06%)	38,45 ± 0,26	40,1
3512/09 – Fórmula infantil (0,02%)	35,93 ± 0,53	37,32
2112/06 – Salsicha (0,58%)	38,90 ± 1,21	38,22

#### **4.6 – Avaliação da especificidade e sensibilidade por PCR qualitativo, PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green e pelo sistema TaqMan dos iniciadores para o alvo lectina**

A especificidade do método de detecção do alvo endógeno, no caso da soja RR, do gene da lectina, deve ser verificada *in silico* nos bancos de dados disponíveis e demonstrada experimentalmente pela ausência de amplificação com DNA genômico de amostras de vegetais filogeneticamente relacionados bem como outros grãos utilizados na produção de alimentos (ENGL, 2008).

##### **4.6.1 – Amplificabilidade dos DNAs extraídos dos vegetais**

As reações de PCR qualitativo com os DNAs extraídos de soja, milho, arroz, trigo, cevada, aveia e mistura de 7 cereais forneceram bandas equivalentes aos

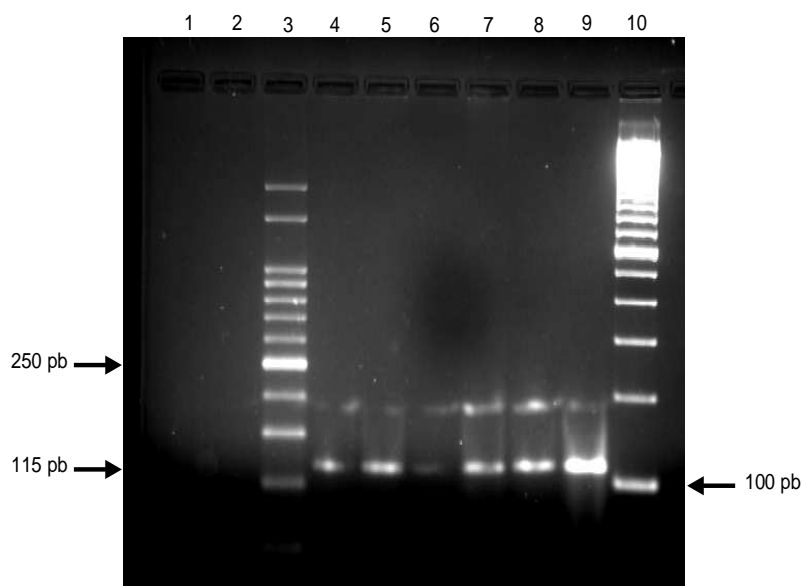
tamanhos citados na Tabela 1 do item 3.3, demonstrando que as soluções continham DNA amplificável e que poderiam ser utilizadas no estudo da especificidade dos novos iniciadores. As soluções de DNA extraídas da amostra de feijão convencional e de feijão transgênico não foram submetidas ao PCR qualitativo. As soluções foram dosadas por espectrofotometria e aquelas que apresentaram concentrações acima de 50ng/  $\mu$ L foram utilizadas nas reações de avaliação da especificidade.

#### **4.6.2 - Avaliação da especificidade por PCR qualitativo**

Os pares de iniciadores listados no item 4.4.1.1 foram testados com os DNAs extraídos do MRC 0%, 0,1%, 1% e 2% de soja RR, DNA de grãos de soja não geneticamente modificada, DNA de amostras de vegetais não geneticamente modificados e de amostras de alimentos processados, listados no item 3.7.2.1. Os pares Lec-F 1205/Lec-R 1334 e Lec-F 1722/Lec-R 1822 não foram testados pelo PCR qualitativo.

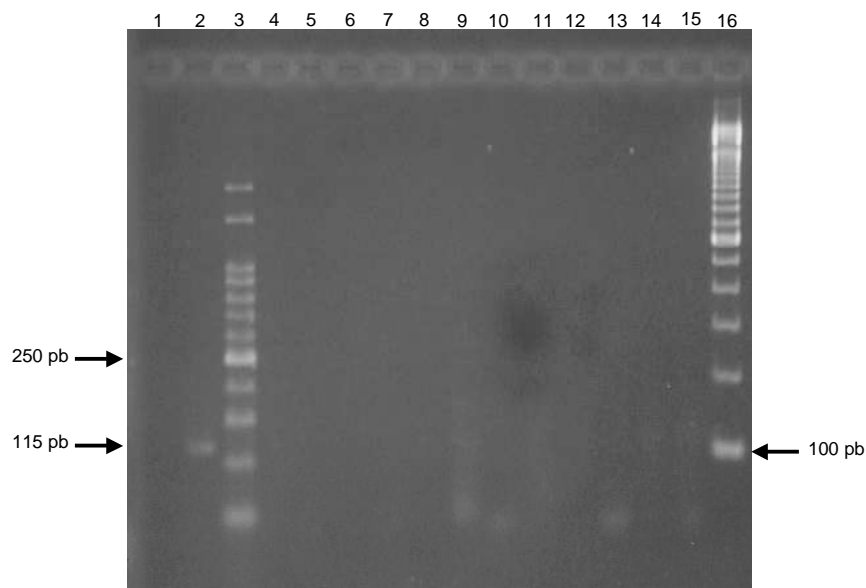
Em relação às reações com o DNA dos MRCs de soja e grãos de soja não-GM, todos os iniciadores amplificaram satisfatoriamente esses materiais. A foto do gel de agarose da amplificação com os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 (115 pb) é apresentada na Figura 12. Quanto às reações com os vegetais não modificados, somente houve amplificação do DNA de cevada com os iniciadores Mlec-F/Mlec-R com banda de aproximadamente 130 pb e fraca amplificação de trigo e arroz com os iniciadores Lec-F 1663/Lec-R 1773. Nenhuma amplificação foi observada nos vegetais não geneticamente modificados com os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332, conforme demonstrado na Figura 13.

As reações de PCR com as amostras de alimentos processados produziram melhor sinal com os iniciadores Mlec-F/Mlec-R (134pb), Lec-F 1663/Lec-R 1773 (101 pb) e Lec-F 1218/Lec-F 1332 (115pb) e esses iniciadores foram selecionados para os ensaios por PCR em tempo real com SYBR Green. A Figura 14 mostra o gel de agarose da amplificação da lectina nas amostras de alimentos com os iniciadores LecF1218/LecR1332 e MLecF/MLecR.



**Figura 12** – Gel de agarose a 2% da amplificação do gene da lectina do MRC e de grãos de soja com os iniciadores LecF 1218/LecR 1332.

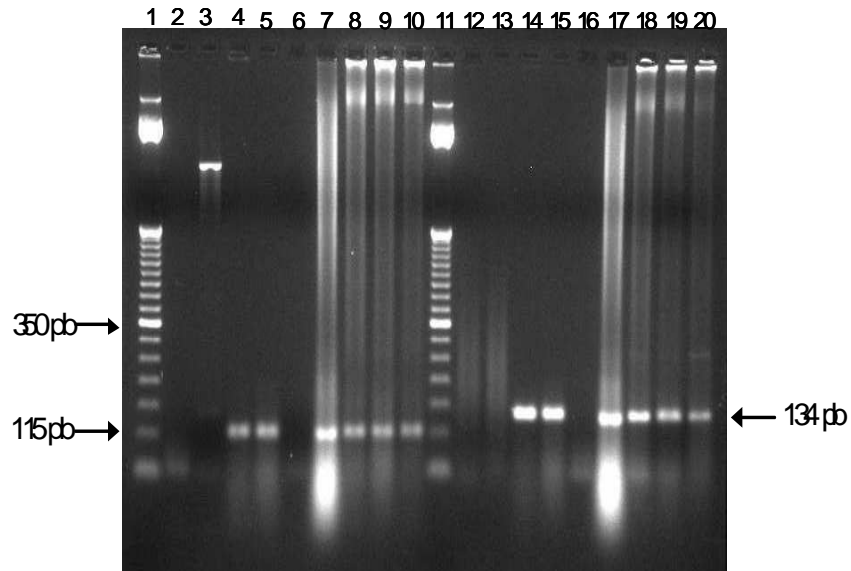
Pistas 3 e 10: PM 50 pb Ludwig-Biotech e PM 100 pb Gibco-BRL; pista 1: controle dos reativos da PCR; pistas 2: DNA de milho Bt 176; pistas 4, 5, 6 e 7: MRC 0,1%, 0,5% e 1% e 2% de soja GM; pistas 8 e 9: DNA de grão de soja não GM.



**Figura 13** – Gel de agarose a 2% da amplificação de lectina nas amostras de vegetais utilizando iniciadores LecF 1218/LecR 1332.

Pistas 3 e 16: PM 50 pb Ludwig-Biotech e PM 100 pb Gibco-BRL; pistas 1: controle dos reativos da PCR; pista 2: MRC soja RR 0%; pistas 4: arroz; pistas 5: arroz integral; pista 6: cevada; pista 7: trigo; pista 8: trigo; pista 9: mistura de cereais; pistas 10: aveia; pistas 11 e 12: feijão; pista 13 a 15: milhos Bt176, MON810, GA21





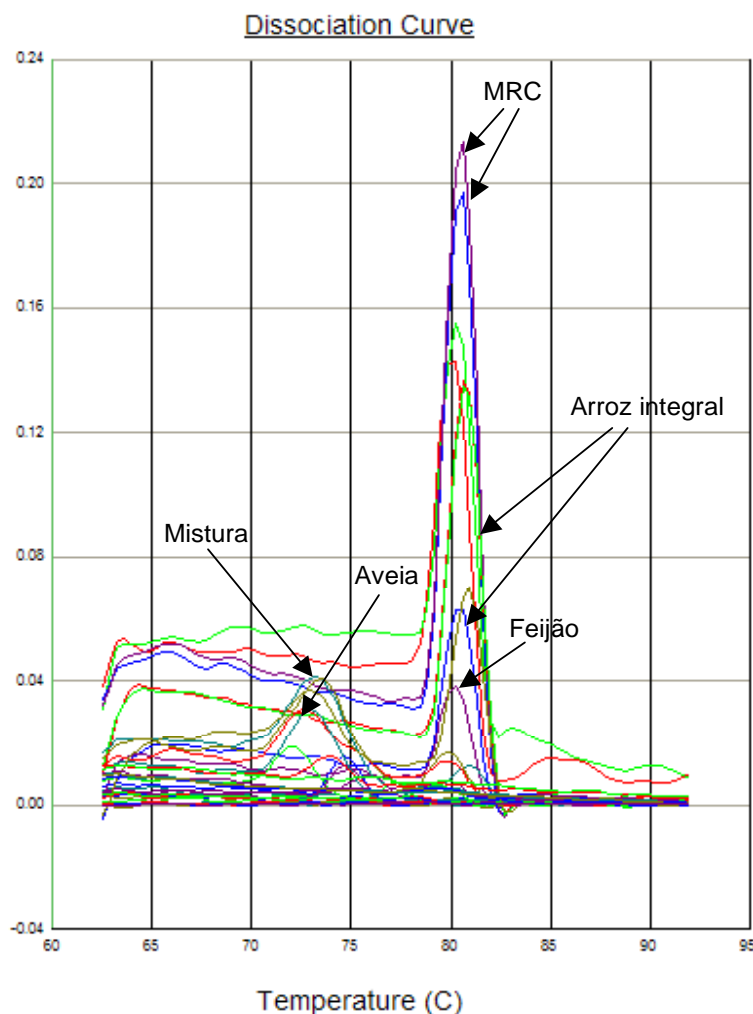
**Figura 14** – Gel de agarose a 2% da amplificação de lectina (pistas 2-10 iniciadores LecF1218/LecR1332 e pistas 12-20 iniciadores MLecF/MLecR) em amostras de alimentos.

Pistas 1 e 11: PM 50 pb Gibco-BRL; pistas 2 e 12: controle dos reativos da PCR; pistas 3 e 13: DNA de *E. coli*; pistas 4 e 14: soja GM; pistas 5 e 15: bebida a base de soja com frutas (0%); pistas 6 e 16: sopa desidratada (2%); pistas 7 e 17: salsicha (0,58%); pistas 8 e 18: mistura para panqueca (>5%); pistas 9 e 19: farinha de trigo (>5%); pistas 10 e 20: biscoito (FEPAS-2,4%).

#### 4.6.3 – Avaliação dos iniciadores para o alvo lectina por PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green

Todos os pares de iniciadores listados no item 4.4.1.1 foram testados pelo sistema SYBR Green com os DNAs extraídos de soja e de outros vegetais. Os pares Lec-F 1205/Lec-R 1334 e Lec-F 1722/Lec-R 1822 amplificaram os DNAs de arroz, milho, cevada e trigo com Tms próximas à da soja e, portanto foram descartados. Os iniciadores Mlec-F/Mlec-R (134 pb), Lec-F 1663/Lec-R 1773 (111 pb) e Lec-F 1218/Lec-R 1332 (115 pb) amplificaram o MRC de soja e a soja não GM em Cts médios de 23 com produtos de amplificação de Tm em torno de 80,6-81°C. As reações dos DNAs extraídos dos milhos, trigo, aveia, cevada, feijão e mistura de sete cereais com os iniciadores Mlec-F/ Mlec-R e Lec-F 1663/Lec-R 1773 produziram a amplificação de produtos de Tm em torno de 65,6°C o que pode ser indicativo de dímeros de iniciadores uma vez que as concentrações não foram otimizadas. Os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 amplificaram uma amostra de aveia e uma de

mistura de sete cereais em Ct acima de 36 e Tm em torno de 70°C indicando novamente formação de produtos inespecíficos. Em relação ao DNA extraído de arroz integral, todos os iniciadores testados amplificaram com este vegetal em Cts em torno de 32 com produtos de amplificação de Tm 80,6°C, semelhantes aos produtos resultantes da amplificação da soja. A Figura 15 mostra a curva de dissociação resultante da amplificação dos MRC e vegetais com os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332. O resumo dos resultados está mostrado na Tabela 15.



**Figura 15** – Curva de Dissociação do MRC de soja RR e outros vegetais após PCR em tempo real com os iniciadores LecF-1218/LecR-1332.

**Tabela 15** – PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green com os diferentes iniciadores do alvo lectina.

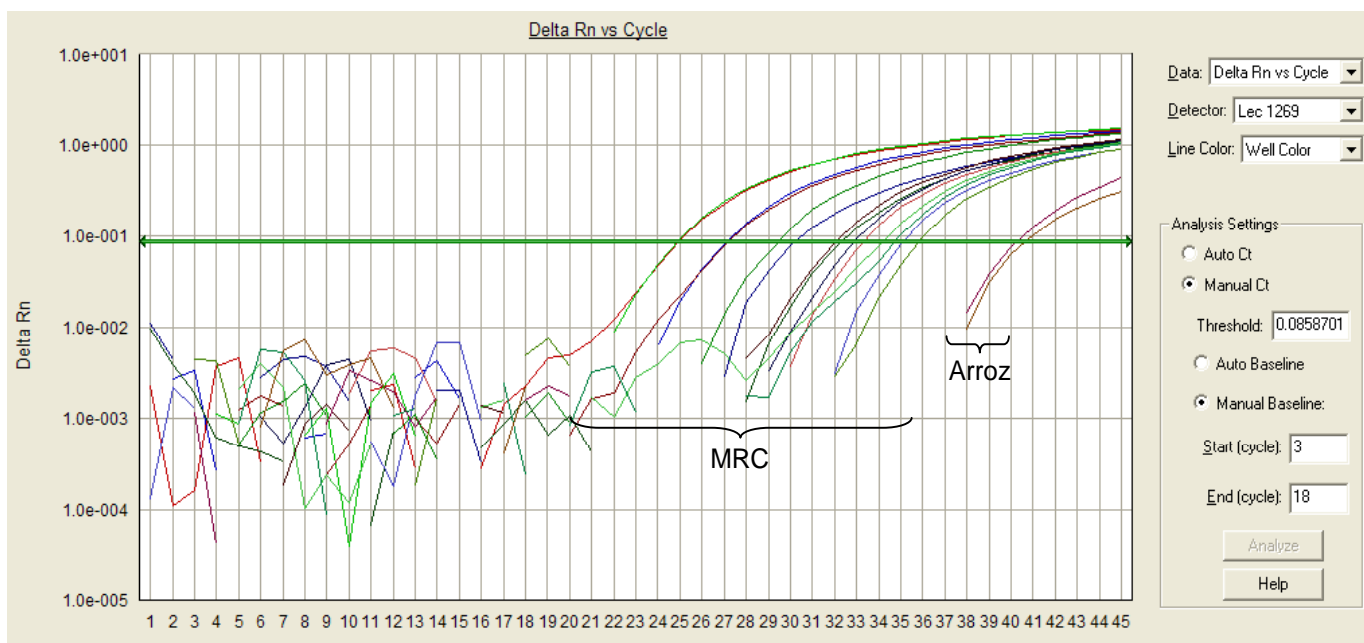
Pares de iniciadores estudados	Ct da amplificação / Tm		
	MRCs e soja não GM	milhos, trigo, aveia, cevada, feijão e mistura de sete cereais	arroz integral
Lec-F1205/Lec-R1334 (130 pb)	23 / 82°C	39 / 80°C	NR
Lec-F1722/Lec-R1822 (101 pb)	23 / 77°C	39 / 77°C	NR
Mlec-F/Mlec-R (134 pb)	23 / 81°C	36 / 65,6°C	32 / 80,6°C
Lec-F1663/Lec-R1773 (111 pb)	23 / 80,6 °C	38 / 65,6°C	32 / 80,6°C
Lec-F1218/Lec-R1332 (115 pb)	23 / 80,6 °C	36 / 70°C	32 / 80,6°C

#### 4.6.4 – Avaliação da especificidade por PCR em tempo real pelo sistema TaqMan

Foram realizadas reações de amplificação dos DNAs extraídos dos MRC e de vegetais com os seguintes iniciadores e sondas:

- Mlec-F / Mlec-R e sonda Lec1
- Lec-F 1663/Lec-R 1773 e sonda Lec1
- Lec-F 1663/Lec-R 1773 e sonda Lec 1720
- Lec-F 1218/Lec-R 1332 e sonda Lec 1269

As reações de amplificação dos DNAs extraídos do MRC e de soja não GM com todos os iniciadores e sondas ocorreram em média próximas ao Ct 24, compatíveis com a amplificação desses MRC com o kit 35S. As reações com os DNAs de milho, feijão, cevada, trigo, aveia e mistura de sete cereais não apresentaram amplificação até o Ct 45 com todos os iniciadores. Em relação às reações com DNA de arroz, houve amplificação próxima ao Ct 36 em todas as corridas efetuadas, confirmando os resultados obtidos pelo sistema SYBR Green (Tabela 16). Esses resultados indicam que estes iniciadores são específicos para soja, mas devem ser utilizados com restrição em amostras de alimentos que contenham arroz na sua composição. A Figura 16 mostra a curva de amplificação com os MRC e vegetais não GM.



**Figura 16** – Curva de amplificação do MRC de soja RR e outros vegetais pelo sistema TaqMan com os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 e sonda Lec 1269.

Também foram realizadas reações de PCR em tempo real com os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 em amostras de biscoito de chocolate, farinha de milho e massa alimentícia mista instantânea que não amplificaram o gene da lectina com o kit 35S. As amostras de biscoito e de farinha de milho também não apresentaram amplificação até o Ct 45, confirmando a especificidade desses iniciadores para várias matrizes de alimentos. Porém a amostra de massa alimentícia mista instantânea, que contém farinha de arroz, apresentou amplificação de lectina no Ct 39, confirmando a restrição do método para análise de produtos que contenham arroz na composição.

**Tabela 16** – PCR em tempo real pelo sistema TaqMan com os diferentes iniciadores do alvo lectina

Pares de iniciadores e sondas*	Materiais quantificados		
	MRCs e soja não GM	milho, feijão, cevada, trigo, aveia e mistura de sete cereais	arroz
Mlec-F/Mlec-R + Lec1*	+ (Ct 24)	-	+ (Ct 36)
Lec-F1663/Lec-R1773 + Lec1*	+ (Ct 24)	-	+ (Ct 36)
Lec-F1663/Lec-R1773 + Lec 1720*	+ (Ct 24)	-	+ (Ct 36)
Lec-F1218/Lec-R1332 + Lec 1269*	+ (Ct 24)	-	+ (Ct 36)

#### **4.6.5 - Avaliação da sensibilidade frente a amostras de alimentos**

Foram utilizadas amostras de alimentos contendo soja, obtidas a partir de diferentes níveis de processamento, variando de uma amostra de grãos de soja sem nenhum processamento, uma de fórmula infantil contendo a proteína isolada, uma amostra de bebida a base de soja com frutas contendo proteína de soja e uma de proteína texturizada de soja (PTS) que é obtida através de alto processamento. Em todas essas amostras é esperada amplificação da lectina entre os Cts 24 e 28 uma vez que são produtos contendo alto teor de soja. Também foram analisadas amostras em que a soja é utilizada apenas como ingrediente como no caso da amostra de salsicha, duas amostras de sopa desidratada e uma amostra de carne vegetal sendo, portanto, esperada amplificação em Cts mais altos.

Foram testados todos os iniciadores e sondas listadas no item 4.6.4.

Os iniciadores Mlec-F/Mlec-R e sonda Lec1 amplificaram todas as amostras em pelo menos 2 Cts acima dos Cts obtidos com a amplificação com kit 35S. Aumentando-se a concentração dos iniciadores para 900 nM, observou-se que a amplificação das amostras com maior concentração de soja se deu em Cts próximos aos do kit 35S, mas os Cts das amostras de sopa desidratada, carne vegetal e salsicha continuavam mais altos (+1 Ct).

A mesma situação ocorreu com os iniciadores Lec-F 1663/Lec-R 1773 e sonda Lec 1. Já quando utilizou-se a sonda Lec 1720 e aumentou-se a concentração dos iniciadores para 900 nM, a amplificação das amostras com baixa concentração de soja se deu em Cts bem mais próximos aos obtidos como o kit 35S (exceto um das amostras de sopa desidratada).

Nas reações com os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 e sonda Lec 1269 os Cts resultantes da amplificação de todas as amostras foram bem semelhantes aos obtidos quando as mesmas amostras foram amplificadas com o kit 35S, demonstrando que esses iniciadores e sonda possuem maior sensibilidade na amplificação de amostras de alimentos contendo concentrações variáveis de soja. A Tabela 17 mostra os Cts obtidos na amplificação com esses iniciadores e os obtidos com o kit 35S.

**Tabela 17** – Comparação dos Cts na amplificação do alvo lectina utilizando-se o kit 35S e os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 e sonda Lec 1269.

<b>Amostra de alimento</b>	<b>Ct do alvo lectina com LecF1218/R1332 sonda 1269</b>	<b>Ct do alvo endógeno com TaqMan® 35S Soy Detection kit</b>
1783/06 – Grão de soja	26,66 ± 0,45	26,80
3145/06 – Bebida a base de soja com frutas	27,52 ± 0,16	27,20
482/08 – TPS	25,69 ± 0,32	26,20
1761/06 – Carne vegetal	28,86 ± 0,30	27,94
2229/08 – Sopa desidratada	30,77 ± 0,72	30,56
3870/07 – Sopa desidratada	33,83 ± 0,08	31,27
1284/03 – Fórmula infantil	28,31 ± 0,44	27,00
2112/06 – Salsicha	29,50 ± 0,68	28,66

**4.7 - Avaliação dos parâmetros de desempenho do método de quantificação de soja RR<sup>®</sup> cujo alvo é a região de integração do promotor 35S e o genoma da planta (quantificação evento específica) utilizando os primers RR-F147 / RR-R227 com a sonda RR 182 pelo sistema TaqMan.**

**4.7.1 – Otimização da concentração dos iniciadores da reação de PCR em tempo real**

A matriz dos iniciadores demonstrou que a concentração de 300 nM tanto do iniciador na direção (5'-3') como o iniciador reverso foi a que amplificou o MRC a 5% no menor Ct (29,80) com maior delta R<sub>n</sub> (6,19), devendo ser utilizada nas reações de PCR em tempo real.

**4.7.2 - Curvas analíticas e eficiência da amplificação**

Em dez (10) corridas utilizando MRC nas concentrações 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5% de soja RR, em duplicata, foram avaliados os coeficientes de correlação linear (R<sup>2</sup>) e a sensibilidade foi medida através da inclinação da reta (coeficiente angular) que corresponde à eficiência da reação de PCR em tempo real. O ajuste das curvas foi avaliado pela ANOVA bem como os desvios de linearidade. Os valores dos parâmetros

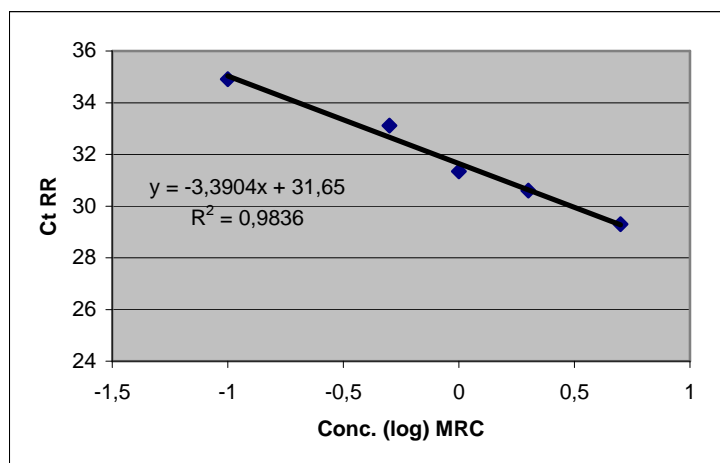
das curvas estão demonstrados na Tabela 18. A Figura 17 mostra a curva analítica de uma das corridas.

**Tabela 18** – Parâmetros ds curvas analíticas na amplificação do alvo RR em diluições seriadas do MRC 5%.

Corrida	Coefficiente de correlação ( $R^2$ )	Coefficiente linear (intercepto)	Coefficiente angular (inclinação da reta)	Eficiência
1	0,9810	32,34116	-3,104045	109%
2	0,9865	32,02744	-3,298079	101%
3	0,9836	31,85900	-3,393386	97%
4	0,9837	30,80744	-3,729804	85%
5	0,9918	31,35441	-3,713699	86%
6	0,9901	33,03679	-3,624316	89%
7	0,9843	31,67648	-3,71253	86%
8	0,9812	32,09530	-3,516275	92%
9	0,9810	32,18614	-3,518996	92%
10	0,9837	30,92559	-3,328676	100%

Os valores dos coeficientes de correlação linear obtidos nas (10) curvas variaram de 0,9810 a 0,9918, valores acima do mínimo aceitável de 0,98 (CODEX ALIMENTARIUS, 2010; ENGL, 2008) demonstrando proporcionalidade entre as concentrações do MRC e os Cts obtidos na amplificação. A análise de variância demonstrou ajuste das curvas de regressão e ausência de desvios de linearidade em seis (6) corridas. As outras quatro curvas apresentaram desvio de linearidade verificada através da análise dos resíduos entre os dois pontos obtidos em cada concentração da curva analítica.

Os coeficientes angulares obtidos em dez corridas demonstraram grande sensibilidade da reação de PCR em tempo real correspondendo de 86% a 109% de eficiência. Esses valores se encontram acima do mínimo aceitável de 85%, conforme preconizado pelo ENGL (2008) e de acordo com os estudos de validação de Scholtens et al. (2010).



**Figura 17** – Curva analítica obtida com o log das concentrações do MRC de soja e os Ct em cada concentração (Ct RR) utilizando os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 e sonda RR 182

#### 4.7.3 - Reprodutibilidade das medidas dos Cts (precisão intercorridas)

A reprodutibilidade do método foi avaliada através das medidas dos Cts obtidos com soluções de DNA extraídas dos MRC de soja RR em dez (10) corridas que foram realizadas em períodos distintos pelo mesmo operador utilizando o mesmo equipamento. Os resultados foram expressos através da média dos Cts, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) e estão representados na Tabela 19.

A média dos valores dos Cts foi proporcional à concentração analisada, variando de 29,47 a 35,37 ciclos com máximo de coeficiente de variação de 2,41% na concentração de 1%. Estes resultados são bastante similares aos obtidos na validação do método que usa o kit 35S em que foram encontrados resultados entre 29,46 e 35,59 ciclos e variação máxima de 1,93% o que demonstra que as medidas de Ct são bastante reprodutíveis com aparente robustez desse método.

Os coeficientes de variação estão de acordo com outros estudos de reprodutibilidade ds medidas de Ct utilizando sistema TaqMan (YANG et al., 2005a) na quantificação de outros vegetais geneticamente modificados.



**Tabela 19** – Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação do alvo RR em cada concentração do MRC.

Conc. RR	Ct 1	Ct 2	Ct 3	Ct 4	Ct 5	Ct 6	Ct 7	Ct 8	Ct 9	Ct 10	Média	<sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)
<b>MRC 0,1%</b>	35,06	35,03	34,91	35,30	35,88	36,66	35,23	35,66	35,99	34,24	35,40	0,68	1,91
<b>MRC 0,5%</b>	33,65	33,36	33,12	33,40	33,29	33,87	33,23	32,96	32,87	32,21	33,20	0,46	1,38
<b>MRC 1%</b>	32,15	32,11	31,34	31,50	31,37	33,26	31,13	32,48	32,17	30,47	31,82	0,78	2,45
<b>MRC 2%</b>	31,50	31,02	30,6	30,50	30,48	32,18	30,56	30,62	30,89	30,04	30,84	0,61	1,97
<b>MRC 5%</b>	30,21	29,54	29,3	29,10	29,07	30,29	29,12	29,81	30,07	28,65	29,52	0,56	1,89

MRC= material de referência certificado

<sup>a</sup>DP= desvio padrão; <sup>b</sup>CV (%)= coeficiente de variação

Cada valor corresponde à média de 2 reações

#### 4.7.4 - Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de soja RR (precisão intercorridas)

A precisão também foi avaliada em cinco (5) corridas independentes através da quantificação do MRC 5% diluído contendo de 4425 a 22 cópias de soja RR. Os coeficientes de variação (CV%) oscilaram de 3,6 a 12,7% sendo as maiores variações encontradas na menor concentração (22 cópias). Este nível de variação foi semelhante ao encontrado com o kit 35S o que demonstra que as medidas de Ct são bastante reprodutíveis. Os resultados estão demonstrados na Tabela 20.

**Tabela 20** – Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de soja RR utilizando os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 e sonda RR 182

Alvo	Nº cópias DNA	Nº estimado de cópias					Média	DP <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>
		1 <sup>a</sup> corrida	2 <sup>a</sup> corrida	3 <sup>a</sup> corrida	4 <sup>a</sup> corrida	5 <sup>a</sup> corrida			
soja RR	4425	4809	5075	4535	4216	4331	4593	351	7,6
	885	858	767	1047	848	866	877	103	11,7
	221	189	198	200	254	231	214	27	12,6
	44	48	50	50	53	51	50	1,8	3,6
	22	23	24	23	18	19	21	2,7	12,7

<sup>a</sup>DP= desvio padrão; <sup>b</sup>CV (%)= coeficiente de variação

Cada valor corresponde à média de 2 reações

## **4.8 - Avaliação dos parâmetros de desempenho do método de quantificação de soja RR cujo alvo é o gene endógeno da lectina utilizando os iniciadores Lec-F 1218 / Lec-R 1332 e a sonda Lec 1269 pelo sistema TaqMan.**

### **4.8.1 – Otimização da concentração dos iniciadores**

A matriz dos iniciadores demonstrou que a concentração de 300 nM tanto do iniciador na direção (5'-3') como o iniciador reverso foi a que amplificou o MRC a 5% no menor Ct (24,00) com maior delta  $R_n$  (4), devendo então ser utilizada nas reações de PCR em tempo real.

### **4.8.2 - Curvas analíticas e eficiência da amplificação**

Em sete (7) corridas utilizando MRC 5% diluído de forma a obter 88500, 1770, 4425, 880, 440 e 220 cópias de lectina, em duplicata, foram avaliados os coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ) e a sensibilidade foi medida através da inclinação da reta (coeficiente angular) que corresponde à eficiência da reação de PCR em tempo real. O ajuste das curvas foi avaliado pela ANOVA bem como os desvios de linearidade.

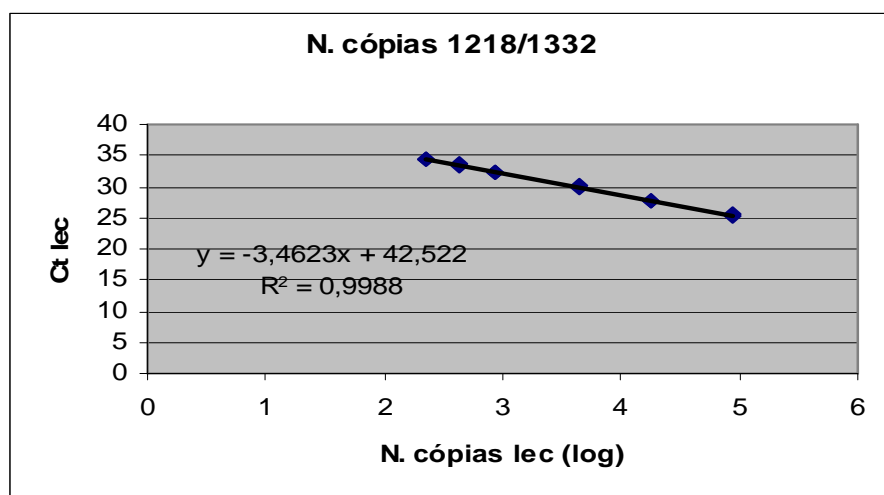
Os valores dos coeficientes de correlação linear obtidos nas sete curvas variaram de 0,9908 a 0,9988, valores acima do mínimo aceitável de 0,98 (CODEX ALIMENTARIUS, 2010; ENGL, 2008) demonstrando grande proporcionalidade entre as diluições do MRC e os Cts obtidos na amplificação. Os coeficientes angulares obtidos nas sete (7) corridas demonstraram grande sensibilidade da reação de PCR em tempo real correspondendo de 86% a 91% de eficiência. Esses valores se encontram acima do mínimo aceitável de 85%, conforme preconizado pelo ENGL (2008).

A análise de variância demonstrou ajuste das curvas de regressão em todas as corridas e em somente uma corrida foi observado desvio de linearidade.

Os valores dos parâmetros das curvas estão demonstrados na Tabela 21. A Figura 18 mostra a curva analítica de uma das corridas.

**Tabela 21** – Parâmetros das curvas analíticas na amplificação da lectina em diluições seriadas do MRC 5%

Corrida	Coefficiente de correlação (R <sup>2</sup> )	Coefficiente linear (Intercepto)	Coefficiente angular (Inclinação da reta)	Eficiência
1	0,9988	42,522	-3,4623	94%
2	0,9908	43,053	-3,7028	86%
3	0,9920	42,448	-3,5915	89%
4	0,9963	43,0227	-3,6048	89%
5	0,9928	42,4098	-3,5113	93%
6	0,9955	42,998	-3,5621	91%
7	0,9986	42,632	-3,6623	87%



**Figura 18** - Curva analítica obtida com o log do número de cópias de lectina e os Ct de cada diluição (Ct lec) utilizando os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 e sonda Lec 1269

#### 4.8.3 - Reprodutibilidade das medidas dos Cts (precisão intercorridas)

A reprodutibilidade do método foi avaliada através das medidas dos Cts obtidos com soluções de DNA extraídas dos MRC de soja RR em sete (7) corridas que foram realizadas em períodos distintos pelo mesmo operador utilizando o mesmo equipamento. Os resultados foram expressos através da média dos Cts, desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) e estão representados na Tabela 22.

Na amplificação do gene da lectina foram obtidos valores de Ct médios variando de 24,22 a 24,87 ciclos com máximo de coeficiente de variação de 4,25% na concentração de 0,1%. Estes resultados são bastante similares aos obtidos na

validação do método que usa o kit 35S em que foram encontrados valores médios de Ct entre 24,30 a 24,41 ciclos com variação máxima de 3,89%, o que demonstra que as medidas de Ct são bastante reprodutíveis com aparente robustez desse método.

**Tabela 22** – Reprodutibilidade das medidas dos Cts na amplificação do alvo lectina.

N. cópias lectina	Ct 1	Ct 2	Ct 3	Ct 4	Ct 5	Ct 6	Ct 7	Média	<sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)
88500	25,41	24,83	24,73	25,4	25,05	25,39	24,51	25,04	0,37	1,47
17700	27,76	27,09	27,12	27,42	27,47	27,91	27,10	27,41	0,37	1,21
4400	29,98	29,76	29,25	29,83	29,45	29,90	29,20	29,62	0,32	1,08
880	32,17	32,13	31,88	32,37	32,28	32,64	31,93	32,2	0,26	0,81
440	33,44	33,02	33,38	33,77	33,38	33,31	33,4	33,39	0,22	0,66
220	34,43	34,57	33,72	34,46	33,88	34,83	34,06	34,28	0,4	1,17

<sup>a</sup>DP= desvio padrão; <sup>b</sup>CV (%)= coeficiente de variação  
Cada valor corresponde à média de 2 reações

#### 4.8.4 - Reprodutibilidade na quantificação do número de cópias de lectina (precisão intercorridas)

A precisão também foi avaliada em 7 corridas independentes através da quantificação do MRC 5% diluído contendo de 88500 a 220 cópias de lectina. Os coeficientes de variação (CV%) oscilaram entre 4,6 e 19,5 (Tabela 23).

**Tabela 23** – Reprodutividade na quantificação do número de cópias de lectina utilizando os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 e sonda Lec 1269.

Alvo	Nº cópias DNA	Nº estimado de cópias							Média	DP <sup>a</sup>	CV % <sup>b</sup>
		1 <sup>a</sup> corrida	2 <sup>a</sup> corrida	3 <sup>a</sup> corrida	4 <sup>a</sup> corrida	5 <sup>a</sup> corrida	6 <sup>a</sup> corrida	7 <sup>a</sup> corrida			
lectina	88500	87575	83447	85766	77388	87899	87165	88768	85429	3949	4,6
	17700	18350	20467	18529	21296	17989	17207	17420	18751	1547	8,2
	4400	4192	3890	4729	4568	4908	4754	4652	4527	359	7,9
	880	977	891	876	902	767	809	836	865	69	7,9
	440	420	512	335	369	372	524	332	409	80	19,5
	220	217	195	269	237	269	196	219	228	31	13,5

<sup>a</sup>DP= desvio padrão; <sup>b</sup>CV (%)= coeficiente de variação  
Cada valor corresponde à média de 2 reações

#### 4.9 – Quantificação do teor de soja RR em 02 matrizes de alimentos utilizando o método evento específico desenvolvido

A aplicabilidade do novo método foi avaliada através da quantificação de uma amostra de biscoito contendo 2,4% de soja RR, de mistura de farinhas contendo 1,48% de soja RR e do MRC 0,5%. Foram realizadas quatro (4) corridas para quantificar a amostra de biscoito e três (3) corridas para quantificar as amostras de mistura de farinhas e do MRC 0,5%. Em cada corrida foram utilizadas soluções de DNA provenientes da mesma extração e cada medida de Ct representa a média de duas leituras. A amostra de mistura de farinhas utilizada como controle negativo da amplificação do alvo RR não amplificou o alvo RR até o Ct 45 e amplificou o alvo lectina em torno do Ct 25.

A Tabela 24 apresenta os dados obtidos na amplificação das três amostras em função da inclinação (eficiência) da curva analítica produzida com várias diluições do MRC 5%, os Cts obtidos em cada alvo, o número de cópias calculado de cada alvo, o percentual de OGM calculado e o erro relativo da quantificação.

**Tabela 24** – Quantificação de amostras de alimentos utilizando o método desenvolvido.

Amostras	Lectina inclinação / Ct / n. cópias	Soja RR inclinação / Ct / n. cópias	% OGM	Erro relativo (%)
biscoito	-3,7028 / 28,28 / 9765	-3,3655 / 33,43 / 266	2,72%	13%
biscoito	-3,5915 / 28,26 / 8921	-3,3655 / 33,59 / 238	2,67%	11%
biscoito	-3,5113 / 28,05 / 12291	-3,4721 / 31,91 / 411	3,34%	39%
biscoito	-3,5621 / 28,24 / 13901	-3,7049 / 33,62 / 293	2,1%	12,5%
mistura de farinhas	-3,7028 / 24,86 / 81904	-3,7049 / 31,66 / 991	1,21%	18%
mistura de farinhas	-3,5915 / 24,96 / 74007	-3,6806 / 32,13 / 837	1,13%	23%
mistura de farinhas	-3,5621 / 26,17 / 52988	-3,5546 / 32,33 / 876	1,65%	11,5%
MRC 0,5%	-3,7028 / 24,65 / 93330	-3,3655 / 32,36 / 553	0,59%	18%
MRC 0,5%	-3,5113 / 24,34 / 140020	-3,4721 / 31,45 / 558	0,40%	20%
MRC 0,5%	-3,5621 / 24,75 / 132685	-3,6806 / 32,55 / 644	0,48%	4%

Os valores encontrados na inclinação das curvas analíticas variaram de -3,7028 a -3,5113 na amplificação do alvo lectina e de -3,7049 a -3,3655 na amplificação do alvo RR. Esses valores correspondem a uma média de 90% de eficiência do alvo lectina e 91% do alvo RR na amplificação do MRC 5%, em diluições seriadas, com os

iniciadores e sondas desenvolvidas. Estes valores estão em conformidade com o estabelecido pelo ENGL (2008) para as curvas analíticas e os valores encontrados na literatura (CANKAR et al. 2006).

Em relação à amplificação do alvo lectina pode-se observar que não houve muita variação dos Cts entre as corridas dos três tipos de amostras analisadas. A média dos Cts da amostra de biscoito (28,21) e da mistura de farinhas (25,14) foi muito semelhante aos valores obtidos na amplificação dessas amostras pelo kit 35S (29,00 e 27,00, respectivamente). A média dos Cts do MRC 0,5% (24,58) ficou bem próximo da média do Ct encontrado no estudo da reprodutibilidade dos Cts na amplificação com o kit 35S (24,41).

Quanto ao alvo RR, a média da amostra de mistura de farinhas (Ct 32,04) também foi semelhante à encontrada na amplificação com o kit 35S (31,85) e a média dos Cts do MRC 0,5% (32,12) ficou 1,0 Ct abaixo da média dos Cts na reprodutibilidade com o kit 35S (33,18).

Os percentuais de OGM encontrados na amostra de mistura de farinhas (1,21%, 1,13% e 1,65%) e na quantificação do MRC 0,5% (0,59%, 0,40%, 0,48%) correspondem a 18%, 23% e 11,5% de erro relativo na quantificação da mistura de farinhas e a 18%, 20% e 4% de erro relativo na quantificação do MRC 0,5%. Esses valores demonstram que este novo método apresentou exatidão dentro do recomendado para análises de OGM em alimentos de  $\pm 25\%$  (ENGL, 2008) e que pode ser utilizado com essa matriz.

Na quantificação da amostra de biscoito, em três corridas foram encontrados os valores de 2,72%, 2,67% e 2,1% de OGM com um erro de 13%, 11% e 12,5% demonstrando exatidão dentro do preconizado. Porém, em uma corrida, o percentual ficou em 3,34% (39% de erro). Nesta corrida pode ser observado que o Ct obtido na amplificação do alvo RR ficou em 31,91 (Tabela 24), indicando uma maior eficiência na amplificação desse alvo, o que resultou numa superestimativa do teor de OGM. Destacamos que esta amostra fez parte do ensaio de proficiência GeMMA, rodada 27 e, pelo relatório encaminhado, o resultado de 3,34% também seria satisfatório pois se encontra dentro da variação esperada satisfatória – z-score entre 0,9 a 5,9%.

A grande influência das propriedades das matrizes dos alimentos nos resultados da quantificação foi demonstrada por Cankar et al. (2006) quando comparou, primeiramente, o efeito de quatro matrizes de milho e quatro matrizes de soja na eficiência da quantificação por PCR em tempo real e, em larga escala, o efeito de 205 amostras de soja e milho. No estudo preliminar, nas matrizes de milho não houve

diferenças de eficiências entre o alvo endógeno (invertase) e o alvo OGM. No caso das matrizes de soja, fortificadas com 160 ng de DNA extraído do MRC 5%, foram detectadas diferenças de eficiência entre os alvos na amostra de ração e também a eficiência do alvo RR na ração foi bem maior do que a eficiência da amplificação do alvo RR no MRC. No estudo em larga escala com diferentes matrizes de alimentos contendo soja (grão, farinha, ração, produtos cárneos, tofu) a eficiência foi avaliada através de diluições dessas amostras. A maioria das amostras demonstrou eficiência em torno de 1 (100%), sendo que a maior variabilidade foi observada nos produtos cárneos e rações que representam matrizes mais complexas.

A superestimativa encontrada na amostra de biscoito demonstra a dificuldade da quantificação quando se utiliza o método com duas curvas analíticas em que qualquer variação na eficiência da amplificação dos alvos pode causar grande alteração no resultado final, principalmente quando se trabalha com matrizes complexas.

Os resultados com a amostra de biscoito indicam que o método desenvolvido é adequado para essa matriz e que estudos devem ser realizados com outras matrizes e com diferentes teores de soja RR para posterior validação do método.

Os métodos evento específicos são os únicos métodos que realmente identificam o OGM, pois são direcionados à junção do material genético inserido e do material genético da planta, que vai caracterizar o evento de transformação. No sistema europeu, por ocasião da solicitação da entrada no mercado de um OGM, a empresa que desenvolveu o evento tem que informar o método de identificação evento específico, o método de extração de DNA apropriado para uso em algumas matrizes e fornecer o material de referência, se este não estiver disponível comercialmente. A partir dessas informações, o método é submetido à validação através de estudo interlaboratorial internacional (ZĚL et al, 2008).

No Brasil, há aproximadamente 10 anos, se iniciou o plantio da soja tolerante ao herbicida glifosato, a soja Roundup<sup>®</sup> Ready e, para a sua identificação e quantificação existem vários métodos presuntivos e construção específicos já descritos e somente um método evento específico validado internacionalmente. Enquanto não havia outros eventos de soja geneticamente modificada aprovados, os métodos presuntivos e os métodos construção específicos eram apropriados para identificar e quantificar a soja RR em grãos e na maioria dos alimentos processados. Com a aprovação dos dois eventos de soja tolerante ao herbicida glifosinato de amônio, que possuem na sua construção o promotor p35S, surgiu a demanda pela utilização dos métodos mais

específicos, como o que foi desenvolvido neste trabalho, que possibilite a diferenciação entre da soja RR e as outras geneticamente modificadas que deverão começar a ser comercializadas em curto prazo.



## 5 . CONCLUSÕES

Os métodos de extração de CTAB e DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini kit foram eficientes na extração de DNA das amostras de proteína texturizada de soja, fórmula infantil e extrato de soja fornecendo soluções de DNA de boa qualidade, com rendimento compatível com outros métodos de extração de produtos contendo soja. A sensibilidade dessas preparações avaliada pela amplificação de lectina por PCR qualitativo também não demonstrou diferenças entre os métodos.

Em relação à extração de DNA a partir do MRC RR<sup>®</sup> 5%, nenhum dos dois métodos forneceu preparações de alta pureza, indicando uma possível presença de inibidores e moléculas de RNA e alto coeficiente de variação entre as extrações. A sensibilidade também foi baixa na amplificação por PCR qualitativo da lectina. No entanto, as reações de amplificação do gene da lectina pela PCR em tempo real com preparações extraídas do MRC e de grãos de soja pelo método CTAB não demonstraram a interferência dessas substâncias nas análises de quantificação.

A eficiência da reação de PCR também foi utilizada como parâmetro de avaliação de desempenho dos métodos de extração, através de análises comparativas das curvas analíticas obtidas com a amplificação da lectina e do promotor p35S. A análise de variância dos valores dos Cts obtidos na amplificação de uma série concentrações de cada alvo não revelou diferenças significativas indicando que, em termos de linearidade, não existe diferença entre as curvas obtidas com DNA extraídos pelos dois métodos, indicando que esses dois métodos fornecem preparações de DNA apropriadas para quantificação.

Apesar dos resultados pouco favoráveis da extração do MRC pelo método CTAB quanto ao rendimento e variabilidade entre as extrações, a ausência de interferentes da PCR em tempo real nas preparações de DNA extraídas por este método aliado os resultados da linearidade e da comparação das curvas analíticas obtidas com a amplificação da lectina e do promotor p35S, nos levaram a continuar utilizando o método CTAB na extração do DNA tanto dos MRC como das amostras de alimentos pela maior praticidade, fácil preparo dos reativos e pelo seu baixo custo.

Os parâmetros das curvas analíticas obtidas na amplificação dos MRC soja RR<sup>®</sup> demonstraram linearidade, eficiência e sensibilidade do método que utiliza o “TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection kit”.

Os ensaios de precisão e exatidão com o MRC nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5% indicaram que este método apresenta exatidão entre 2,4% e 10% e precisão entre 12,7% e 24%. As medidas dos Cts foram altamente reprodutíveis, demonstrando robustez desse método na rotina do laboratório.

Os limites de detecção (LOD) absolutos e relativos do método do kit 35S ficaram em torno de 10 cópias e 0,0125%, respectivamente. Os limites de quantificação (LOQ) absolutos e relativos ficaram em torno de 40 cópias e 0,05%, respectivamente. Estes valores indicam que este método tem sensibilidade para quantificar materiais geneticamente modificados abaixo e acima do limite de 1% estipulado pela legislação.

O kit “TaqMan<sup>®</sup> GMO 35S Soy Detection” foi capaz de amplificar todas as amostras de diferentes matrizes de alimentos, mesmo aquelas com concentração de OGM com teores bem abaixo de 1%.

As amostras de alimentos foram coletadas aleatoriamente em cinco diferentes regiões onde está localizada a maioria das indústrias de alimentos, como parte de programa de monitoramento e as marcas selecionadas foram representativas da produção de cada tipo de produto amostrado. A quantificação demonstrou a presença de soja RR com teores menores de 1% em 63,2% das amostras e teores maiores do que 1% em 36,8% das amostras nas categorias grãos de soja, fórmulas infantis, PTS, farinhas de soja, farelo de soja, sopa desidratada e ração para animais. Esses resultados demonstraram a presença de soja RR em um largo espectro de produtos alimentícios e, apesar do número de amostras analisadas, a detecção de OGM acima de 1% em 36% dos produtos sugerem que muitas indústrias brasileiras ainda não estão cumprindo a legislação brasileira de rotulagem, não observando os direitos de escolha do consumidor. Esta situação demonstra a necessidade de contínuos programas de monitoramento a serem conduzidos pelas autoridades de saúde.

Foram testados dez pares de iniciadores para amplificação do alvo RR correspondente à junção 5' promotor 35S/genoma da planta. Os resultados dos

ensaios de especificidade e sensibilidade com as amostras de alimentos contendo diferentes concentrações de soja RR<sup>®</sup>, com os vegetais geneticamente modificados e com o MRC por PCR qualitativo, PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green e sistema TaqMan demonstraram que os iniciadores RR-F 147/RR-R 227 e sonda RR 182 são capazes de detectar a sequência de soja RR, podendo ser utilizados na amplificação de diversas matrizes de alimentos contendo concentrações variáveis de soja RR.

Foram testados 5 pares de iniciadores para a amplificação do alvo lectina. Os resultados nos ensaios de especificidade por PCR qualitativo e por PCR em tempo real com SYBR Green e sistema TaqMan demonstraram que os iniciadores Lec-F 1218/Lec-R 1332 e sonda Lec 1269 são específicos para soja, mas devem ser utilizados com restrição em amostras de alimentos que contenham arroz na sua composição. As reações com amostras de alimentos demonstraram que esses iniciadores e sonda possuem grande sensibilidade na amplificação de amostras contendo concentrações variáveis de soja.

Os parâmetros de desempenho quanto à linearidade, eficiência da PCR em tempo real e precisão dos Cts e na quantificação do número de cópias demonstraram que o método de quantificação de soja RR desenvolvido neste trabalho apresenta linearidade, eficiência da PCR entre 86 e 109%, precisão na quantificação do número de cópias entre 3,6 a 12,7% e que as medidas dos Cts são altamente reprodutíveis (CV 2,45%).

Os parâmetros de desempenho relativos à linearidade, eficiência da PCR em tempo real e precisão dos Cts e na quantificação do número de cópias demonstraram que o método de quantificação de lectina desenvolvido apresenta linearidade, eficiência da PCR entre 86 e 94% e precisão na quantificação do número de cópias entre 4,6 e 19,5% e que as medidas dos Cts são altamente reprodutíveis (CV 1,47%).

Os resultados da quantificação do teor de OGM na amostra de biscoito, mistura de farinhas e no MRC 0,5%, utilizando os pares de iniciadores e sondas desenvolvidos e testados neste trabalho, demonstraram que este novo método apresenta exatidão dentro do recomendado para análises de OGM podendo ser utilizado nessas matrizes

de alimentos, e que devem prosseguir os estudos com outras matrizes com diferentes teores de soja RR, para posterior validação deste método.

O método evento específico desenvolvido neste trabalho vai possibilitar a quantificação diferenciada entre a soja RR e os eventos de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosinato de amônio, aprovados recentemente no Brasil, uma vez que o método atualmente utilizado no INCQS está baseado na amplificação do promotor 35S que é utilizado na construção desses três eventos.

## 6 – BIBLIOGRAFIA

AGBIOS. GM Database. 2009. Disponível em: < <http://www.agbios.com> > Acesso em: fev. de 2010.

AHMED, F.E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology**, v.20, n.5, p.215-223, 2002.

ALARY, R. et al. Comparison of simplex and duplex real-time PCR for the quantification of GMO in maize and soybean. **Food Control**, v.13,p. 235-244, 2002.

ANDERSEN, C.B. et al. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **J. Agric. Food Chem.** v. 54, p. 9658-9663, 2006.

ANKLAM, E. et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organism in agricultural crops and plant-derived food products. **Eur Food Res Technol**, v.214, p.3-26, 2002.

APPLIED BIOSYSTEMS (a). TaqMan<sup>®</sup> Genetically Modified Organism (GMO) Detection Kit. **User's Guide**. U.S.: Applied Biosystems Corporation P/N 4327687 rev. A, 2001.

APPLIED BIOSYSTEMS (b). Primer Express<sup>®</sup> software v2.0. Applications-based primer design software. **User's Manual**. U.S.: Applied Biosystems Corporation P/N 4329500A, 2001.

APPLIED BIOSYSTEMS. Sequence Detection System. **Chemistry Guide**. Part Number 4348358 Rev. A, 11/2003.

APPLIED BIOSYSTEMS. Absolute quantification. Applied Biosystems 7300/7500 Real Time PCR System. Part Number 4347825. Rev. A, 1/2004.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Plant DNA c-values databases of The Royal Botanic Garden, Kew, UK. 2004. Disponível em: <http://www.rbgekew.org.uk/cval/exhibition/html/homepage.html> Acesso em: dez. 2009.

BERDAL, K. G.; HOLST-JENSEN, A. Roundup Ready<sup>®</sup> soybean event specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. **Eur Food Res Technol**, v.213, p.432-438, 2001.

BOMFIM, K. et al. RNA mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.20, n.6, p. 717-726, 2007.

BONFINI, L. GMO methods database. Report on PCR methods submitted to ring trial validation. JRC Technical Notes. 2009. Disponível em <<http://mbg.jrc.ec.europa.eu/home/ict/methodsdatabase.htm>> Acesso em: fev. 2010.

BRANQUINHO, M.R.; FERREIRA, R.T.B.; CARDARELLI-LEITE, P. Survey of compliance with labeling legislation in food containing GMOs in Brazil. **J. Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 220-225, 2010.

BRASIL. Lei nº 10.688 de 13/06/2003. Estabelece normas para comercialização da produção de soja da safra de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jun. 2003a.

\_\_\_\_\_. Lei nº 10.814 de 15/12/2003. Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja geneticamente modificada da safra de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF n. 244 de 16 dez. 2003b.

\_\_\_\_\_. Portaria nº 2658 de 22/12/2003 M.J. Regulamenta o emprego do símbolo no rótulo dos produtos transgênicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 dez. 2003c.

\_\_\_\_\_. Decreto nº 4.680 de 24/04/2003. Regulamenta o direito à informação quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 abr. 2003d.

BRASIL. Instrução normativa interministerial nº 01 de 01/04/2004. Define os procedimentos complementares para aplicação do Decreto nº 4680 de 24 abr. 2003, na forma de regulamento técnico. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 abr. 2004a.

\_\_\_\_\_. Medida provisória nº 223 de 14/10/2004. Estabelece normas para o plantio e comercialização da produção de soja geneticamente modificada da safra de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 out. 2004b.

\_\_\_\_\_. Lei nº 11.105 de 24/03/2005. Lei de Biossegurança. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 mar. 2005.

BROD, F. C. A.; ARISE, A. C. M. Quantification of Roundup Ready ® soybean in Brazilian soy-derived foods by real-time PCR. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1027-1032, 2008.

BROD, F. C. A. et al. Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. **LWT Food Science and Technology**, v. 40, p. 748-751, 2007.

BURNS, M. et al. Comparison of plasmid and genomic DNA calibrants for the quantification of genetically modified ingredients. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 224, p. 249-258, 2006.

BUSTIN, R.; NOLAN, T. Analysis of mRNA expression by Real-time PCR. In: **Real-time PCR: an essential guide**. Norfolk, U.K.: Horizon Bioscience, 2004. p. 125-184.

CANKAR, K et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **BMC Biotechnology**, v.6, p. 37-51, 2006.

CARDARELLI, P. et al. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. **Food Control**, v.16, p. 859-866, 2005.

CARDARELLI-LEITE, P.; FERREIRA, R.T.B.; BRANQUINHO, M.R. Utilização do Gráfico de Shewhart como ferramenta analítica no controle da quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos por PCR em tempo real. **Revista Analytica**, n. 46, (abril-maio), 2010 (*in press*).

CARTAGENA PROTOCOL ON BIOSAFETY. **Convention on Biological Diversity, United Nations Environment Programme** 2000. Disponível em <<http://www.biodiv.org/biosafety/protocol.asp>> Acesso em: dez. de 2006.

CENTER FOR FOOD SAFETY - CFS. **Genetically engineered crops and foods: worldwide regulation and prohibition**. Washington, DC, 2006. <<http://www.centerforfoodsafety.org>> Acesso em: 9 mar. 2010.

CHARELS, D. et al. Toward metrological traciability for DNA fragment ratios in GM quantification. 3. Suitability of DNA calibrants studied with a MON 810 corn model. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 3268-3274, 2007.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Commercial approvals**. Disponível em: <<http://ctnbio.gov.br>> Acesso em: mar. de 2010.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex Principles for the Risk Analysis of Food Derived from Modern Biotechnology**. Rome: WHO; FAO, 2003. (CAC/GL 33-2003).

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Proposed draft guidelines on criteria for methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins, in particular in foods derived from modern biotechnology**. Budapest: WHO; FAO, 2010. 34p. 33<sup>th</sup> Session, (CX/MAS 10/31/3).

COMMUNITY REFERENCE LABORATORY (CRL-GMFF). **Status of dossiers**. CRL-GMFF validation process. Last updted 27/01/2010. Disponível em <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>. Acesso em: mar. 2010.

CONAB - National Company of Food Supply (2009). Brazilian Crop Assessment: grains: second estimate. November 2009. Disponível em <http://www.conab.gov.br>



Acesso em: dez. de 2009.

CORBISIER, P. et al. Quantitative determination of Roundup Ready soybean (*Glycine max*) extracted from highly processed flour. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 383, p. 282-290, 2005.

CORBISIER, P. et al. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 1. Effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of Bt 176 corn by Real-Time PCR. **J. Agric. Food Chem** v. 55, p. 3249-3257, 2007.

DEISINGH, A. K.; BADRIE, N. Detection and approaches for genetically modified organisms in food. **Food Research International**, v.38, p. 639-649, 2005.

DEMEKE, T.; JENKINS, G.R. Influence of DNA extraction methods, PCR onhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.396, n.6, p.1977-1990, 2010.

DING, J. et al. Validation of a rice specific gene, *sucrose phosphate synthase*, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes. **J. Agric. Food Chem** v. 52, p. 3372-3377, 2004.

DINON, A. Z.; DE MELO, J. E.; ARISI, A. C. M. Monitoring of MOM810 genetically modified maize in foods in Brazil from 2005 to 2007. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 515-518, 2008.

Di BERNARDO, G. et al. Comparative evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. **Biotechnol. Prog.**, v. 23, p. 297-301, 2007.

Di PINTO, A. et al. A comparision of DNA extraction methods for food analysis. **Food control**, v.18, p. 76-80, 2007.

ELENIS, D. S. et al. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. **Anal. Bioanal Chem.** v. 392, n. 3, p. 347-54, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Soja em números** (safra 2008/2009) 2008. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br>> Acesso em: dez. 2009.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) nº 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC. **Official Journal European Union** 2003, L 268.

EUROPEAN COMMISSION . Health & Consumers Directorate General. Final report of a mission carried out in Brazil from 22 April to 30 April 2009. [S.L.], 2009. 23p. (DG (SANCO) 2009-8301 – MR – Final).

EUROPEAN Network of GMO Laboratories (ENGL). **Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing**. Version 13-10-2008. Disponível em <<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>> Acesso em: mar. 2010.

FALK, M. C. et al. Food biotechnology: benefits and concerns. **J. Nutr.**, v. 132, n. 6, p. 1384-90, 2002.

FARIA, J. C. et al. Partial resistance to bean golden mosaico vírus in transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris*) line expressing a mutant rep gene. **Plant Science**, Limerick, v.171, n.5, p.565-571, 2006.

FERRARI, C.S. et al. Evaluation of polymerase chain reaction and DNA isolation protocols for detection of genetically modified soybean. **International Journal of Food Science and Technology** v. 42, p. 1249-1255, 2007.

FERREIRA, R.T.B.; BRANQUINHO, M R.; CARDARELLI-LEITE, P. Soja geneticamente modificada em alimentos contendo farinha e preparados à base de farinha de trigo. Detecção e adequação à legislação de rotulagem. **Braz. J. Food Technol.**, v.12, n. 3, p. 241-248, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. 2000

FOTI, N. et al. Real-Time PCR multiplex methods for the quantification of Roundup ready soybean in raw material and processed food. **Eur. Food Res. Technol**, v.222, p. 209-216, 2006.

FUNKE, T. et al. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. **PNAS**, v. 103, n. 35, p. 13010-13015, 2006.

GÄSPARĪC, M. B. et al. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. **BMC Biotechnology**, v. 8, n. 26, p.1-12, 2008.

GÄSPARĪC, M. B. et al. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 396, p. 2023-2029, 2010.

GREINER, R., KONIETZNY, U. Presence of genetically modified maize and soy in food products sold commercially in Brazil from 2000 to 2005. **Food Control**, v. 19, p. 499-505, 2008.

GRYSON, N., DEWETTINCK, K., MESSENS, K. Detection of genetically modified soy in doughs and cookies. **Cereal Chem**, v. 84, n. 2, p. 109 –115, 2007.

GRYSON, N., MESSENS, K., DEWETTINCK, K. Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. **J. Sci. Food Agric.**, v. 84, p. 1357-1363, 2004.

HAMELS, S. et al. A PCR-microarray methods for the screening of genetically modified organisms. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 228, p. 531-541, 2009.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HIRD, H. et al. Determination of percentage of RoundUp Ready<sup>®</sup> soya in soya flour using real-time polymerase chain reaction: interlaboratory study. **J AOAC Int.** v. 86, p.66 –71, 2003.

HOLST-JENSEN, A. et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Anal. Bioanal. Chem.**, v.375, p.985-993, 2003.

HOLST-JENSEN, A.; BERDAL, K.G. The Modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. **J. AOAC.**, v. 87, n. 4, p. 927-936, 2004.

HUANG, C.C.; PAN, T.M. Event-specific real-time detection and quantification of genetically modified Roundup Ready soybean. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p.3833-3839, 2005.

HÜBNER, P. et al. Validation of PCR methods for quantification of genetically modified plants in food. **J. AOAC.**, v. 84, n. 6, p. 1855-1864, 2001.

IIDA, M. A. et al. Development of taxon-specific sequences of common wheat for the detection of genetically modified wheat. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 6294-6300, 2005.

ISO 21570:2005 ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE NORMALIZAÇÃO. Foodstuffs: Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – quantitative nucleic acid based methods. Switzerland: ISO,2005. vi,103p.

ISO 21571:2005 ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE NORMALIZAÇÃO. Foodstuffs: Nucleic acid based methods of analysis of genetically modified organisms and derived products – information to be supplied and procedure for the addition of methods to ISO 21569,ISO 21570 or ISO 21571. Switzerland:ISO,2005. 18p.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM groups: 2009. The First Fourteen Years, 1996 to 2009. Disponível em: <<http://www.isaaa.org>> Acesso em: mar. de 2010.

JAPAN. Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries. Food and Marketing Bureau. **Notification nº1775**. Tokyo, Japan, 2000.

JOINT RESEARCH CENTRE. **Event-specific method for the quantification of maize line NK603 using real-time PCR. Protocol**. 2005. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>. Acesso em: fev. 2010.

JOINT RESEARCH CENTRE. **Event-specific method for the quantification of soybean line 40-3-2 using real-time PCR. Protocol**. 2009. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>. Acesso em: fev. 2010.

JOINT RESEARCH CENTRE. **Report on the validation of a DNA extraction method from soybean seeds**. 11/september/2007. Disponível em: <http://gmo.crl.jrc.ec.europa.eu> . Acesso em: fev. 2010.

KOK, E. J. et al. DNA methods: critical review of innovative approaches. **J. AOAC Int.**, v. 85, n. 3, p. 797-800, 2002.

KOREA. Ministry of Agriculture and Forestry. **Notification nº 2000-31**. Seoul, Korea, 2000.

KURIBARA, H. et al. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. **J AOAC Int.**, v.85, n.5, p.1077-1089, 2002.

KUTYAVIN, I.V. et al. 3'Minor-groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n.2, p.655-661, 2000.

LIPP, M. et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. **J. AOAC Int.**, v. 82, n. 4, p. 923-928, 1999.

LIPP, M. et al. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **J AOAC Int.**, v.88, n.1, p.136-155, 2005.

MALATESTA, M. et al. Ultrastructural morphometrical and immunocytochemical analyses of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soybean. **Cell Structure and Functions**, v. 27, p. 173-180, 2002.

MALATESTA, M. et al. Fine structural analyses of pancreatic acinar cell nuclei from mice fed on genetically modified soybean. **Eur. J. Histochemistry**, v. 47, n. 4, p.385-388, 2003.

MARCELINO, F. C.; GUIMARÃES, M. F. M.; BARROS, E. G. Detecção e quantificação de alimentos geneticamente modificados: o panorama brasileiro. **Revista Ceres**, V. 54, n. 313, p.240-250, 2007.

MARCELINO, F. C.; GUIMARÃES, M. F. M.; De BARROS, E. G. Detection and quantification of Roundup Ready<sup>®</sup> soybean residues in sausage samples by conventional and real-time PCR. **Ciênc.Tecnol. Aliment.**, Campinas, Supl. 28, p. 38-45, 2008.

MARMIROLI, N. et al. Methods for detection of GMOs in food and feed. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.392, p. 369-384, 2008.

MATSUOKA, T. et al. A Method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. **Journal of Food Hygienic Society of Japan**, v. 41, p. 137-143, 2000.

MATTARUCCHI, E. et al. Development and applications of real-time PCR standards for GMO quantification based on tandem-marker plasmids. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 221, p. 511-519, 2005.

MEYER, R. et al. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection os soya in processed meat products. **Z. Lebensm Unters Forsch**, v. 203, p. 339-344, 1996.

MICHELINI, E. et al. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 392, p. 355-367, 2008.

MIRAGLIA, M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p. 1157-1180, 2004.

MONSANTO COMPANY. **Updated molecular characterization and safety assessment of Roundup Ready® soybean event 40-3-2**. Confidential report. Product Safety Center. 2000.

MORIUCHI, R. et al. Applicability of quantitative PCR to soy processed foods containing Roundup Ready soy. **Food Control**, v.18, p. 191-195, 2007.

NEWELL, C. Plant transformation technology – developments and applications. **Molecular Biotechnology**, v.16, p. 53-65, 2000.

OLEXOVÁ, L.; DOVICOVICOVÁ, L.; KUČHTA, T. Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. **Eur. Food Res. Technol** ,v. 218, p. 390-393, 2004.

PADGETTE, S. R. et al. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop. Sci.**, v. 35, p. 1451-1461, 1995.

PAÜLI, U.; LINIGER, M.; SCHROTT, M. Quantitative detection of genetically modified soybean and maize: modified evaluation in a Swiss ring trial. **Mitt. Lebensm. Hyg.**, v. 92, p.145-158, 2001.

PEANO, C. et al. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extract from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 6962-6968, 2004.

PERMINGEAT, H.R.; REGGIARDO, M.I.; VALLEJOS, R.H. Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p. 4431-4436, 2002.

QUERCI, M. et al. Real-time-based ready-to-use multi-target analytical system for GMO detection. **Food. Anal. Methods**, v. 2, p. 325-336, 2009.

QUERCI, M. et al. New approaches in GMO detection. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.396, n.6, p.1991-2002, 2010.

RECH FILHO, E. L. A Agropecuária molecular. In: **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 34, p. 705-719.

REPORT of the EU tender nº XXIV /98 /A3/2001. Development of qualitative as well as quantitative detection methods to identify a genetic modification in soybean and maize products. Disponível em : [http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/gmfood/biotech05\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/gmfood/biotech05_en.pdf). Acesso em: out. 2008.

RØNNING, S.B. et al. A Novel reference gene, *PKABA1*, used in a duplex real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of wheat- and barley-derived DNA. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 682-687, 2006.

ROTT, M.E. et al. Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 5223-5232, 2004.

SAFETY and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. Report of EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. **Food Chemical Toxicology**, v. 46, S2-S70, 2008.

SALVI, S.; D'ORSO, F.; MORELLI, G. Detection and quantification of genetically modified organisms using very short, locked nucleic acid TaqMan probes. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, n. 12, p. 4320-4327, 2008.

SAMPAIO, M.J. Biossegurança das plantas transgênicas. Disponível em <http://www.embrapa.br>. Acesso em: set. 2006.



SANDBERG, M. et al. Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 217, p. 344-349, 2003

SCHOLTENS, I.M.J. Increased efficacy for in-house validation of real-time PCR GMO detection methods. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 396, n. 6, p. 229-233, 2010.

SHINDO, Y. et al. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. **J AOAC Int**, v.85, n.5, p.1119-1126, 2002.

SMITH, D.S.; MAXWELL, P.W.; DE BOER, S.H. Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 9848-9859, 2005.

SMITH, D.S.; MAXWELL, P.W. Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn flour and cornstarch. **Food Control**, v. 18, p. 236-242, 2007.

STANDARD A18/1.5.2. Australia New Zealand Food Authority, User Guide – Labelling Genetically Modified Food. Disponível em:  
[http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/user\\_guide\\_GM\\_labelling\\_0817.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/user_guide_GM_labelling_0817.pdf). Acesso em:10 Jan. 2009.

TANI, H. et al. Quantification of genetically modified soybean by quenching probe polymerase chain reaction. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 2535-2540, 2005.

TAVENIERS, I. et al. Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. **Eur. Food Res Technol.**, v. 213, p. 417-424, 2001.

TAVENIERS, I.; Van BOCKSTAELE, E.; De LOOSE, M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. **Anal. Bioanal. Chem.**,v. 378, n. 5, p. 1198-1207, 2004.

TERRY, C.F.; HARRIS, N. Event-specific detection of roundupready soya using two different real time PCR detection chemistries. **Eur. Food Res. Technol.**, v.213, p.425-431, 2001

TERRY, C.F et al. Real-time detection of genetically modified soya using lightcycler and ABI 7700 platforms with TaqMan, Scorpion and SYBR Green I chemistries. **J AOAC Int.**, v. 85, n.4, p. 938-944, 2002.

TIWARI, S. et al. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 449-467, 2009.

TOYOTA, A. et al. Quantification of genetically modified soybeans using a combination of a capillary-type real time PCR system and a plasmid reference standard. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, n. 4, p. 821-827, 2006.

TRAPMANN, S. et al. Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. Joint Research Centre. 2009. 48p.

VAÏTILINGOM, M. et al. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. **J. Agric. Food Chem.**, v.47,p. 5261-5266, 1999.

Van DUIJIN, G. et al. Detection of genetically modified organisms in food by protein- and DNA-based techniques: bridging the methods. **J AOAC Int.**, v.85, n.3, p. 787-791, 2002.

VECCHIO, L. et al. Ultrastructural analysis of testes from mice fed on genetically modified soybean. **Eur. J. Histochemistry**, v. 48, n. 4, p. 449-454, 2004.

WALLACE, R. B. et al. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to  $\phi_x$  174 DNA: the effect of single base pair mismatch. **Nucleic Acid Res.**, v.6, n.11, p.3543-3557, 1979.

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.

WEIGHARDT, F. European GMO labeling thresholds impractical and unscientific. **Nature Biotechnology**, v.24, n.1, p.23-25, 2006.

WEIGHARDT, F. GMO quantification in processed food and feed. **Nature Biotechnology**, v. 25, n.11, p. 1213-14, 2007.

WINDELS, P. et al. Characterization of the Roundup Ready soybean insert. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 213, p.107-112, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety Department. Modern food biotechnology, human health and development: an evidence-based study. 2005. Disponível em: <[www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech\\_en.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_en.pdf)> Acesso em: mar. 2010.

YANG, L. et al. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. **Plant Cell Rep.**, v. 23, p. 759-763, 2005a.

YANG, L. et al. Event specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction detection of genetically modified MON863 maize based on the 5´-transgene integration sequence. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 9312-9318, 2005b.

YOSHIMURA T. et al. Applicability of the quantification of genetically modified organisms to foods processed from maize and soy. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.2052-2059, 2005.

ŽEL, J. et al. Method validation and quality management in the flexible scope of accreditation: an example of laboratories testing for genetically modified organisms. **Food Anal. Methods.**, v. 1, p. 61-72, 2008.

ZIMMERMANN, A.; LÜTHY, J.; PAULI, U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. **Z. Lebensm Unters Forsch A.**, v. 207, p. 81-90, 1998.