

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Sylvia Kahwage Sarmiento

**DETECÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS EM
ALIMENTOS: TRIAGEM POR QPCR SYBR® GREEN**

Rio de Janeiro

2017

Sylvia Kahwage Sarmento

**DETECÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS EM
ALIMENTOS: TRIAGEM POR QPCR SYBR® GREEN**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Tutora: Maria Regina Branquinho

Preceptor: Rafael Lawson Ferreira

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Sarmiento, Sylvia Kahwage

Detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos:
triagem por qPCR SYBR® Green. / Sylvia Kahwage Sarmiento – Rio de Janeiro:
INCQS/FIOCRUZ, 2017.

51 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) –
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em
Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Preceptor: Rafael Lawson Ferreira

Tutora: Maria Regina Branquinho

1. Alimentos Geneticamente Modificados. 2. Estudos de Validação. 3.
Limite de Detecção. 4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 5.
Controle de Qualidade. I. Título

Sylvia Kahwage Sarmento

**DETECÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS EM
ALIMENTOS: TRIAGEM POR QPCR SYBR® GREEN**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Maria Helena Simões Villas Boas (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Talita Coelho de Souza (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Catia Aparecida Chaia de Miranda (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Rafael Lawson Ferreira (Mestre) - Preceptor
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Maria Regina Branquinho (Doutora) - Tutora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

RESUMO

O crescimento constante da área mundial de cultivo de plantas geneticamente modificadas, em especial o Brasil, e o surgimento de novos eventos transgênicos têm trazido preocupações tendo em vista o aumento no número de produtos alimentícios contendo organismos geneticamente modificados (OGM) sendo comercializados, existindo ainda incertezas de como devem ser regulamentados esses produtos. Legislações e diretrizes vêm sendo criadas a fim de proteger o meio ambiente e a saúde humana como o Protocolo de Cartagena, as especificações do *Codex Alimentarius* para rotulagem de alimentos e de metodologias analíticas, e a Lei de Biossegurança, que regulamenta a pesquisa e o uso comercial dos OGM. Muitos países adotam políticas de rotulagem de produtos alimentícios com estabelecimento de limites da presença intencional de organismos geneticamente modificados. No Brasil, foi criado o Decreto nº 4.680/2003 em que é obrigatória a rotulagem de alimentos com mais de 1% de OGM. Laboratórios estão estudando e validando métodos para detecção e quantificação de genes modificados, que têm sido de grande importância no comércio brasileiro e internacional, especialmente em países que permitem tanto a rotulagem para a presença como para a ausência de transgênicos, com a finalidade de garantir a informação correta nas embalagens para os consumidores. A tradicional estratégia de análise de OGM em alimentos consiste na detecção de dois elementos genéticos comumente utilizados nas construções (P-35S e T-nos) seguida da quantificação evento-específica. No entanto, esta estratégia encontra cada vez mais limitações pela diversidade das novas construções e complexidade dos eventos que vêm sendo desenvolvidos e comercializados. Este trabalho se propôs a implementar a detecção de 5 elementos genéticos (P-35S, T-nos, CTP-2, PAT, BAR) utilizados nas construções dos OGM presentes em alimentos de soja e milho pelo método de triagem por qPCR SYBR® Green, além de estabelecer os limites de detecção (LOD) de cada alvo. Os resultados mostraram que a qPCR SYBR® Green é uma técnica robusta e sensível na amplificação das matrizes de alimentos de soja e milho, estabelecendo limites de detecção com valores abaixo do limite de 1% descrito no Decreto nº 4.680/2003. O método de triagem empregado foi bastante viável na discriminação dos eventos de soja geneticamente modificada presentes nas amostras analisadas, enquanto que a discriminação dos eventos de milho geneticamente modificado foi menor, uma vez que foram encontrados vários possíveis eventos de milho, havendo a necessidade da inclusão de mais um elemento genético na matriz de triagem.

Palavras-chave: OGM. LOD. qPCR SYBR® Green. método de triagem

ABSTRACT

The constant growth of the world-wide area of cultivation of genetically modified plants, especially Brazil, and the emergence of new transgenic events has raised concerns regarding the increase in the number of food products containing genetically modified organisms (GMO) being marketed, there are still uncertainties as to how these products can be regulated. Legislation and guidelines have been created to protect the environment and human health such as the Cartagena Protocol, Codex Alimentarius specifications for food labeling and analytical methodologies, and the Biosafety Law, which regulates research and commercial use of GMO. Many countries adopt food-labeling policies with limits on the intentional presence of genetically modified organisms. In Brazil, Decree 4.680 / 2003 was created in which the labeling of foods with more than 1.0% of GMO is mandatory. Laboratories are studying and validating methods for the detection and quantification of modified genes, which have been of great importance in Brazilian and international trade, especially in countries that allow both labeling for the presence and the absence of transgenics, in order to guarantee the packaging information to consumers. The traditional strategy for analyzing GMO in food consists of detecting two genetic elements commonly used in constructs (P-35S and T-NOS) followed by event-specific quantification. However, this strategy is increasingly constrained by the diversity of the new constructions and complexity of the events being developed and marketed. This work is implemented in a detection of 5 genetic elements (P-35S, T-NOS, CTP-2, PAT, BAR) used in the constructs in addition to of GMO present in soy and corn foods by the screening method by qPCR SYBR Green, set limits of detection (LOD) of each target. The results showed that qPCR SYBR Green is a robust and sensitive technique for the amplification of soya and maize food matrices, with detection limits with values below the 1% limit described in Decree 4.680/2003. The screening method employed was quite feasible in discriminating the events of genetically modified soybean present in the analyzed samples, where as in the discrimination of the events of genetically modified corn was not satisfactory, since most corn events were found possible, need for the inclusion of one more genetic element in the screening matrix.

Keywords: GMO. LOD. qPCR SYBR® Green. screening method

SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOCS – American Oil Chemists Society

Bt – *Bacillus thuringiensis*

CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

CTAB – brometo de cetil-trimetil-amônio

Ct – ciclo threshold

DNA – ácido desoxirribonucleico

ERM – European Reference Materials

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EPSPS – enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintase

GM – Geneticamente Modificado

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

LOD – Limite de detecção

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRC – material de referência certificado

mg – miligrama

mM – milimolar

µL – microlitro

ng – nanograma

NaCl – cloreto de sódio

OGM – organismo geneticamente modificado

PCR – reação em cadeia da polimerase

PG – poligalacturonase

qPCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real

TBE – tris-borato-EDTA

T_m – temperatura de melting

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alvos, nomes dos iniciadores, sequências, e tamanho dos produtos de amplificação.....	30
Tabela 2 – Quantidade e pureza do DNA extraído dos MRC de soja e milho.....	33
Tabela 3 – Quantidade e pureza dos DNA extraídos das amostras de soja e milho.....	34
Tabela 4 – Resultado da amplificação dos produtos por PCR convencional.....	36
Tabela 5 – Especificidade dos iniciadores por qPCR SYBR® Green com as respectivas temperaturas de dissociação.....	37
Tabela 6 – Valores dos LOD dos alvos nos MRC de soja e milho.....	39
Tabela 7 – Detecção presuntiva de OGM nas amostras de alimento.....	43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Métodos comumente utilizados para a transformação de plantas.....	11
Figura 2 – Evolução da área plantada com grãos transgênicos no mundo desde 1996 até 2015.....	13
Figura 3 – Esquema de uma construção de inserto transgênico e possíveis alvos de detecção.....	19
Figura 4 – Curva de dissociação térmica mostrando os diferentes estados de complementariedade das sequências de DNA e relação com a intensidade de sinal fluorescente de SYBR Green.....	22
Figura 5 – Curva de amplificação por PCR em tempo real.....	23
Figura 6 - Gel de agarose da amplificação dos iniciadores T-nos e P35S.....	36
Figura 7 - Curva de amplificação da qPCR SYBR® Green da amostra farinha de soja mostrando a amplificação dos alvos sltm, P35S, T-nos e CTP-2.....	40
Figura 8 – Curva de dissociação dos alvos sltm (80,1°C), P35S (76,8°C, T-nos (72,2°C) e CTP-2 (79,5°C) da qPCR SYBR® Green da amostra de farinha de soja..	41
Figura 9 - Curva de amplificação da qPCR SYBR® Green na amostra de fubá pré-cozido mostrando a amplificação dos alvos ADH, P35S, T-nos e CTP-2, PAT.....	41
Figura 10 - Curva de dissociação dos alvos ADH (76,5°C), P35S (76,8°C), T-nos (72,2°C), CTP-2 (79,5°C) e PAT (77,4°C) da qPCR SYBR® Green da amostra de fubá pré-cozido.....	42

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO.....	10
1.1) BIOTECNOLOGIA MODERNA.....	10
1.2) LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE OGM E ROTULAGEM.....	14
1.3) DETECÇÃO DE OGM EM ALIMENTOS	18
1.4) REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	19
2) JUSTIFICATIVA.....	24
3) OBJETIVOS.....	25
3.1) OBJETIVO GERAL.....	25
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4) MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1) MATERIAIS DE REFERÊNCIA.....	26
4.2) AMOSTRAS.....	26
4.3) PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	26
4.4) MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	27
4.5) DOSAGEM DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS E DOS MATERIAIS DE REFERÊNCIA.....	28
4.6) AMPLIFICAÇÃO POR PCR CONVENCIONAL.....	28
4.7) ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	29
4.8) AMPLIFICAÇÃO POR qPCR SYBR® GREEN.....	29
4.9) DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO (LOD).....	31
4.10) DETECÇÃO PRESUNTIVA DE OGM NAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	31
5) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1) DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E PUREZA DOS DNA EXTRAÍDOS.....	33
5.2) RESULTADOS DA ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES POR PCR CONVENCIONAL.....	35
5.3) RESULTADOS DA ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES POR PCR EM TEMPO REAL COM O SISTEMA SYBR® GREEN.....	37
5.4) RESULTADOS DO LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) DOS MÉTODOS DE TRIAGEM POR PCR EM TEMPO REAL.....	38

5.5) DETECÇÃO PRESUNTIVA DE OGM DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	40
6) CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1) INTRODUÇÃO

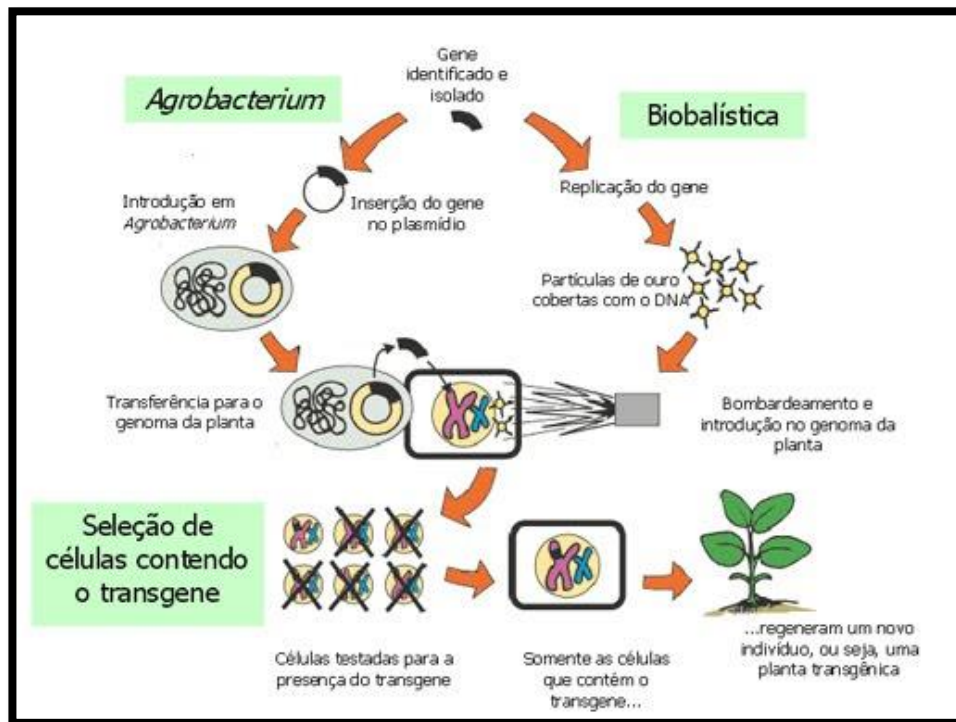
1.1 BIOTECNOLOGIA MODERNA

A biotecnologia moderna emprega técnicas moleculares que podem ser utilizadas para produzir modificações genéticas que resultem em organismos com características diferentes daquelas dos seus semelhantes não modificados (por exemplo, tolerância a herbicidas, resistência a doenças e a fatores bióticos e abióticos). A introdução de sequências genéticas codificantes modificadas em um organismo doador (micro-organismos, plantas e animais) faz com que esse passe a expressar determinadas características de interesse.

A engenharia genética emprega processos que identificam e selecionam sequências de DNA responsáveis por apresentar determinada característica em um organismo doador e transferem estas sequências a um organismo receptor, sem a troca de partes de cromossomos como ocorre no cruzamento convencional de plantas. Estas técnicas moleculares produzem os chamados organismos geneticamente modificados (OGM), como as plantas transgênicas (BRANQUINHO, 2010a).

O termo Organismo Geneticamente Modificado (OGM) é definido pela legislação brasileira como sendo o organismo cujo material genético tenha sido modificado por diversos métodos de transformação de engenharia genética (BRASIL, 2005). Vários métodos de transformação são utilizados para a transferência de DNA recombinante para a produção de um OGM. Nas plantas, os métodos mais utilizados são os de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (bactéria do solo que contém elementos genéticos que podem ser transferidos para uma ampla variedade de espécies vegetais) e a biobalística, produzindo os eventos de transformação (figura 1).

Figura 1: Métodos comumente utilizados para a transformação de plantas.



Fonte: <http://transgeniaemvegetais.blogspot.com.br/2010/08/tecnicas-de-transformacao-de-dna.html> (modificada).

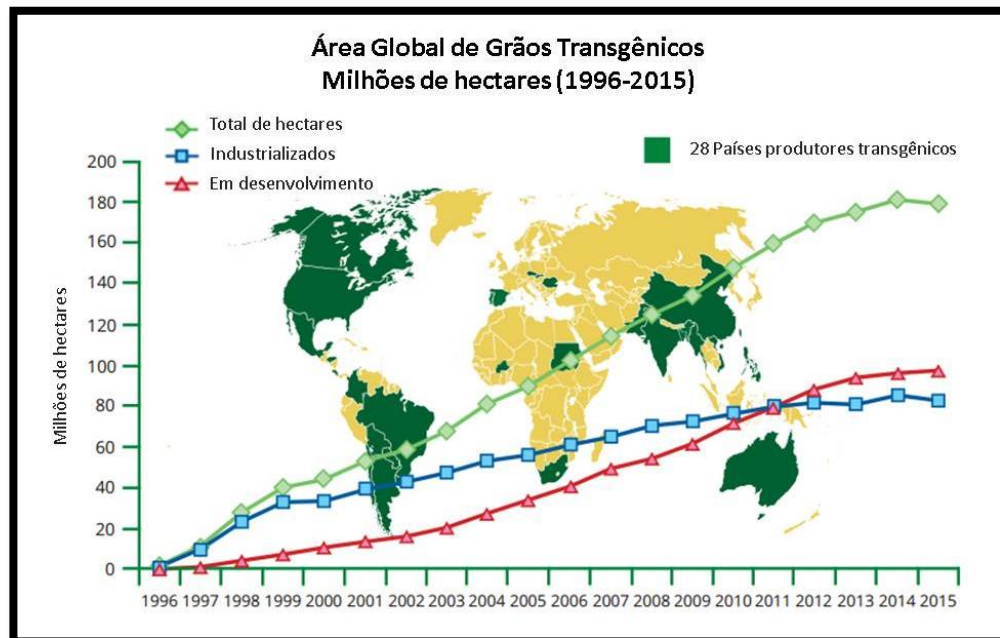
A primeira aprovação comercial de um alimento geneticamente modificado ocorreu nos Estados Unidos em 1994, com o tomate “Flavr Savr”, de amadurecimento tardio, desenvolvido pela Calgene Inc. No caso do Flavr Savr™, os cientistas conheciam a existência de uma enzima, poligalacturonase (PG), responsável pelo incremento da sua maciez de acordo com o amadurecimento, bem como por prolongar o período de amadurecimento. Quando isolaram o gene responsável pela expressão da enzima e o introduziram no genoma, o tomate manteve suas propriedades organolépticas por um período maior do que os tomates comuns. Essa técnica permitiu o desenvolvimento de tomates com um melhor sabor e que podem ser transportados a longas distâncias sem perder sua qualidade (KRAMER et al, 1994).

Os Estados Unidos da América são, atualmente, o país com a maior área de transgênicos no mundo onde, em 2015, foram plantados mais de 70 milhões de hectares de transgênicos. O Brasil e a Argentina, segundo e terceiro países com maior área de transgênicos, plantaram respectivamente 44,2 e 24,5 milhões de

hectares. Esses três países contribuíram com 78% da área plantada com cultivares GM no mundo. Globalmente, inúmeras culturas GM estão sendo comercializadas, tais como soja, milho, algodão, batata, canola, beterraba, alfafa, mamão e abóbora. Vale ressaltar que as principais *commodities* soja, milho, algodão e canola representam cerca de 95% de toda a área plantada de transgênicos no mundo. Entretanto, outras já foram liberadas ou estão em processo de pesquisa, como: feijão, café, cana-de-açúcar, trigo, banana, maçã, alface, eucalipto. Novos produtos vêm sendo desenvolvidos para a liberação e o foco principal são para espécies de grande importância econômica para os produtores. (JAMES, 2015).

A soja é a variedade transgênica mais cultivada no mundo, ocupando cerca de 75,4 milhões de hectares, o que representa 47% da área global de cultivos transgênicos. Em segundo lugar, encontra-se o milho (51 milhões de hectares, 32%), seguido pelo algodão (24,2 milhões de hectares, 15%) e a canola (8,2 milhões de hectares, 5%). As características agrônômicas mais introduzidas em variedades transgênicas são a tolerância a herbicidas, resistência a insetos ou as duas características combinadas, que representam 59%, 15% e 26%, respectivamente, da área plantada mundialmente (JAMES, 2015). Desde sua concepção, em 1996, até os dias atuais é notório o aumento na quantidade da área plantada com culturas geneticamente modificadas ao redor do mundo, principalmente em países em desenvolvimento (figura 2).

Figura 2. Evolução da área plantada com grãos transgênicos no mundo desde 1996 até 2015.



Fonte: <http://ogmespan.blogspot.com.br/>.

Nesse contexto, é importante ressaltar que o crescimento das exportações de soja, milho e algodão no Brasil foi impulsionado principalmente pelo desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas que foram liberadas de forma mais consistentes a partir de 2005, com a criação da nova Lei de Biossegurança nº 11.105, de 24 de março de 2005. Dois anos após a definitiva liberação do cultivo de transgênicos, o Brasil já cultivava 3,5 milhões hectares na área plantada apenas com soja geneticamente modificada. Tratava-se, assim, segundo dados do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia, do maior aumento nominal registrado em culturas de transgênicos no mundo (BORÉM, 2015).

Apesar da previsão do crescimento da produção agrícola, estima-se que até 2050 a população mundial deverá alcançar entre 9 e 11 bilhões de pessoas, o que vai exigir que, no mínimo, seja dobrada a produção de alimentos e, de preferência, sem aumentar drasticamente a área plantada, minimizando assim o impacto sobre nossa biodiversidade (BORÉM, 2015). Nesse sentido, o Brasil vem crescendo

substancialmente sua produção de alimentos por meio de processos biotecnológicos e será parte fundamental para suprir uma considerável parcela de alimentos que o mundo demandará. O país já possui a segunda maior área de transgênicos plantados no mundo, e pelo quinto ano consecutivo, a agricultura brasileira foi a que mais impulsionou o crescimento mundial da área plantada com variedades geneticamente modificadas (JAMES, 2015).

As variedades transgênicas resistentes a insetos mais populares entre agricultores são as de milho, algodão e batata. Conhecidas como Bt, a planta produz seu próprio inseticida e o inseto que a infesta morre, quando dela se alimenta. Esse efeito é obtido introduzindo nas plantas material genético de uma bactéria de solo, *Bacillus thuringiensis* (daí o nome “Bt”), que produz naturalmente uma toxina capaz de destruir o aparelho digestivo de insetos. Isolado o gene responsável pela produção da toxina da bactéria *B. thuringiensis*, este é introduzido em células do vegetal-alvo por meio de outra bactéria, *Agrobacterium tumefaciens*, que tem a capacidade de agregar DNA para dentro de seu núcleo (BARDAU-PIEDNOIR et al, 2010)

No caso das plantas tolerantes a herbicidas destacam-se os cultivos expressando genes de tolerância ao glifosato, como a soja, cujo cultivo é mais prático e econômico, pois esse herbicida pode ser utilizado em aplicação pós-emergência. O glifosato pertence ao grupo químico das glicinas substituídas, é classificado como não seletivo, apresenta amplo espectro de ação, controlando plantas daninhas anuais e perenes, tanto de folhas largas como estreitas. Sua ação é sistêmica, sendo absorvido pelas folhas e tecidos verdes da planta, inibindo a atividade da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3- fosfato sintase (EPSPS), que é catalisadora de reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (GALLI e MONTEZUMA, 2005; VICTORIA FILHO, 2008). Como resultado, as proteínas, vitaminas, metabólitos secundários e fotossíntese da planta são alterados, levando essa à morte. Na planta GM, a introdução do gene de resistência codifica a produção de uma enzima semelhante (CP4 EPSPS), encontrada em micro-organismos, que não é inibida pelo glifosato e, portanto, proporciona à planta os aminoácidos aromáticos necessários para continuar o seu desenvolvimento (DUKE et al, 2003).

1.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE OGM E ROTULAGEM

A legislação brasileira que regulamenta a pesquisa e o uso comercial de organismos geneticamente modificados teve um início complexo pela incerteza jurídica causada pela anterior Lei de Biossegurança nº 8.974 (BRASIL, 1995) e pelo entrelaçamento com outras legislações como a de agrotóxicos e a lei ambiental criando um sistema de licenciamento controlado, dependendo do caso, por até quatro instâncias reguladoras – a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A CTNBio, reformulada pela nova lei de Biossegurança nº 11.105, de 24 de março de 2005, é a instância colegiada multidisciplinar, cuja finalidade é prestar apoio técnico consultivo e assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança, 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 (BRASIL, 2005).

No Brasil, quatro culturas geneticamente modificadas utilizadas na produção de alimentos e ingredientes alimentares - milho, soja, algodão e feijão - estão aprovados pela CTNBio, totalizando 55 eventos, sendo 9 eventos de soja, 33 de milho, 12 de algodão e 1 de feijão, sendo que esse número aumenta a cada ano (CTNBio, 2016). Este fato vem trazendo preocupação quanto à segurança alimentar, pois os conhecimentos científicos sobre as implicações e impactos da liberação em larga escala de plantas transgênicas para o cultivo comercial é ainda insuficiente (MAZZA et al., 2005). A CTNBio liberou a comercialização do eucalipto transgênico em 2015. A espécie liberada é a *Eucalyptus spp L.*, contendo um gene da planta *Arabidopsis thaliana* codificante da proteína Cel 1, que promove um crescimento mais rápido da planta. Essa decisão faz com que o Brasil seja o primeiro país a liberar o eucalipto geneticamente modificado, e segundo técnicos da Futura Gene Brasil Tecnologia Ltda, empresa que solicitou a liberação da planta, o eucalipto modificado tem 20% mais produtividade e poderá ser usado na produção de madeira, papel, entre outros itens. Existem algumas dúvidas científicas sobre os

impactos do plantio do eucalipto transgênico, destacando que o pólen do eucalipto pode ser transportado por insetos, podendo contaminar o mel orgânico dos pequenos produtores que seriam prejudicados no momento da certificação dos seus produtos (TOKARINA, 2015).

Existem, basicamente, dois modelos principais para o controle de riscos dos produtos provenientes da biotecnologia, que são os chamados modelos regulatórios: o modelo regulatório baseado no controle da tecnologia da produção e o modelo regulatório baseado na avaliação do produto final. O primeiro modelo é adotado na União Europeia e no Brasil. Esse primeiro modelo entende que a tecnologia do DNA recombinante apresenta riscos específicos, e tem como pressuposto básico a análise caso a caso, incorporando o Princípio da Precaução, que diz que a ausência de certeza científica sobre a segurança de um produto não impede que medidas preventivas sejam adotadas para prevenir os riscos. Estabelece procedimentos para a avaliação de riscos de OGM, tanto em contenção quanto no caso de sua liberação para o ambiente. Tais procedimentos não têm por objetivo a criação de mecanismos de impedimento do desenvolvimento da tecnologia, mas sim o fornecimento de instrumentos para uma análise caso a caso, permitindo uma maior garantia de segurança para a saúde humana, animal e ambiental (CHAVES et al, 2003).

Já o segundo modelo, é baseado na avaliação do produto final, adotado nos Estados Unidos da América e no Canadá. Entende como essencial para a análise de risco as características do produto final, independentemente de seu processo tecnológico de produção. O produto é avaliado com o mesmo rigor, independente de como é obtido. O princípio adotado não é o da precaução, mas sim da Equivalência Substancial, ou seja, se um produto geneticamente modificado apresenta características equivalentes às apresentadas por seu similar convencional, os mesmos são considerados equivalentes. Tanto o modelo regulatório baseado no controle da tecnologia da produção, como aquele baseado na avaliação do produto final apresentam as mesmas exigências de inocuidade, estabilidade e segurança ambiental, sendo que o princípio básico é o de garantir a segurança humana, dos animais e do ambiente. Independente do modelo regulatório empregado, cada país ou região apresenta mecanismos responsáveis por controlar a produção e utilização de OGM. A União Europeia possui a Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos, que atua na comissão europeia em todos os aspectos de segurança de alimentos, inclusive na avaliação dos OGM (LAWSON-FERREIRA, 2015).

Internacionalmente, a Comissão do *Codex Alimentarius*, um órgão de estabelecimento de diretrizes e de normas para o comércio de alimentos, desde 1990 tem procurado desenvolver recomendações sobre como rotular os alimentos oriundos da biotecnologia e diretrizes sobre os métodos de análises (CARTER e GRUERE, 2010; CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

A rotulagem tem como objetivo informar aos consumidores que um produto ou ingrediente alimentar é, contém ou provém de produtos ou ingredientes geneticamente modificados. Nos últimos anos, muitos países, principalmente os desenvolvidos, adotaram políticas de 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, sendo que mais de 40 países já estabeleceram seus próprios regulamentos para rastreamento e rotulagem desses produtos. Entretanto, ainda existe uma lacuna entre estas abordagens causando uma variação na informação para os consumidores, entre o comércio nacional e o internacional dos alimentos, apesar de haver um consenso de que a rotulagem só se aplica aqueles OGM que foram submetidos a avaliações de risco e que tenham sido considerados seguros para o consumo humano, animal e para o meio ambiente. Outro ponto que merece destaque é o tipo de rotulagem, ou seja, ela pode ser baseada no produto ou no processo, onde no primeiro caso, apenas os produtos com traços detectáveis de materiais ou ingredientes GM são obrigatoriamente rotulados e no segundo caso, no qual a legislação brasileira se enquadra, qualquer produto produzido a partir de um OGM deverá ser obrigatoriamente rotulado, contendo ou não materiais GM no produto final (LAWSON-FERREIRA et al, 2015).

No Brasil, a rotulagem é obrigatória segundo o Decreto nº 4.680 de 24/04/2003, 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 OGM, com presença acima do limite de 1% do produto, contenham a informação da natureza transgênica do produto (BRASIL, 2003a). Além disso, deve também conter o símbolo definido pela Portaria de 2.658 do Ministério da Justiça (BRASIL, 2003b). Apesar de a legislação estar em vigor desde 2003, somente em 2008 os primeiros produtos contendo OGM começaram a conter esta informação no rótulo.

A rotulagem de alimentos e produtos obtidos de plantas geneticamente modificadas parecia, à primeira vista, ser uma opção relativamente simples. Porém a decisão de introduzir rotulagem envolve considerações técnicas, logísticas e comerciais. O Decreto nº 4.680, por exemplo, não deixa claro alguns aspectos que são fundamentais, na área analítica, para a verificação da aplicação do limite de 1%. No caso dos alimentos compostos por ingredientes derivados de diferentes cultivos, fica a dúvida se a avaliação deve ser feita por ingrediente ou sobre o produto em sua totalidade, além de não haver uma especificação da unidade de medida a ser utilizada na quantificação do OGM

1.3 DETECÇÃO DE OGM EM ALIMENTOS

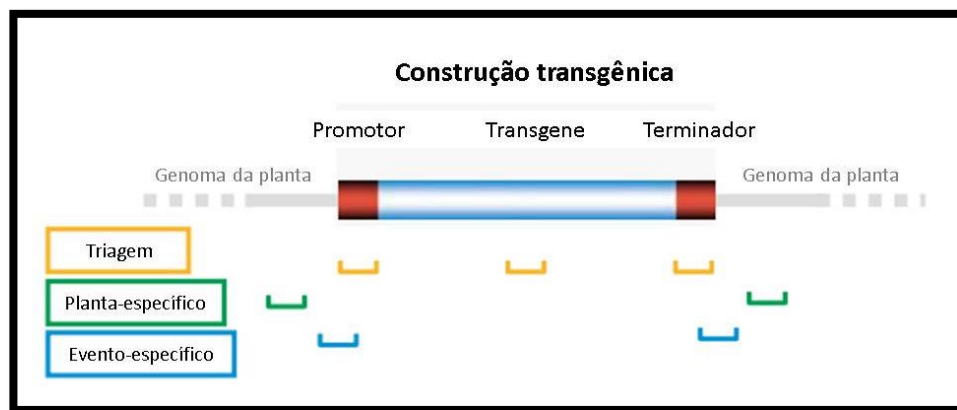
A participação dos laboratórios de saúde pública brasileiros na análise de OGM em alimentos iniciou-se após a ocorrência, no ano 2000, de denúncias de institutos de defesa do consumidor de que produtos alimentícios continham soja transgênica, o que era proibido na época. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) passou a realizar análises de detecção de soja transgênica em 2001 e abriu portas para o surgimento de outros programas para avaliar a implementação da legislação de rotulagem e a possível presença de eventos ainda não autorizados nos produtos alimentícios contendo soja e milho (CARDARELLI et al, 2005; BRANQUINHO et al, 2010b; BRANQUINHO, et al, 2013; FERREIRA et al, 2009).

Os métodos de detecção e quantificação de OGM, principalmente os métodos de análises de sequências de DNA, são influenciados por fatores como 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 (BRANQUINHO, 2010b). Para a obtenção de resultados adequados, é essencial a coleta de dados sobre as sequências de OGM apresentados por laboratórios acreditados para o desenvolvimento de métodos sensíveis, precisos e validados.

Para compreender os métodos utilizados na detecção dos OGM deve-se ter uma base sobre a estrutura desses organismos. Um típico inserto é constituído por pelo menos três elementos genéticos: (1) o promotor que regula a transcrição do

inserto/gene alterado; (2) o gene que foi inserido/alterado, que determina a característica desejável; (3) o terminador que age como sinal de parada, ou seja, responsável pelo término da transcrição (figura 3). A combinação de todos estes elementos genéticos caracteriza um evento, ou seja, a construção gênica característica de um OGM que deve ser integrada no genoma do organismo de forma a ser transmitida para as futuras gerações (CONCEIÇÃO et al., 2004).

Figura 3. Esquema de uma construção de inserto transgênico e possíveis alvos de detecção.



Fonte: http://images.slideplayer.com.br/9/2571236/slides/slide_72.jpg.

1.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A análise rotineira para pesquisa de OGM, através da detecção de sequências de DNA em alimentos, é normalmente dividida em etapas que vão desde a preparação da amostra, extração e purificação do DNA, até a amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e avaliação dos dados. A qualidade e o rendimento do DNA a ser utilizado na PCR são dois fatores críticos na análise de OGM por esta técnica. A etapa de extração e purificação de ácidos nucleicos é o primeiro passo na maioria das técnicas de biologia molecular com objetivo de obtenção de um ácido nucleico puro e íntegro, uma vez que a eficiência da PCR depende da qualidade e pureza do DNA extraído. O método que utiliza o detergente brometo de cetiltrimetil amônio – método CTAB, em geral, é o utilizado para a extração de DNA em plantas (BRANQUINHO, 2010b).

A PCR consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA, caracterizando um método sensível, específico, seguro, capaz de

distinguir as variedades de OGM que apresentam diferentes construções gênicas (YAMAGUCHI et al., 2003). A PCR envolve a síntese enzimática “in vitro” de várias cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase.

A reação da PCR baseia-se na desnaturação do DNA e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos iniciadores que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências da região alvo. No processo de amplificação as duas fitas do DNA se separam e os iniciadores se ligam ao DNA alvo em fitas opostas. Em seguida, a enzima DNA polimerase termoresistente estende os iniciadores, sintetizando duas novas fitas na região de interesse, tomando como molde as fitas originais. Este ciclo é repetido várias vezes de tal forma que a quantidade de DNA amplificado aumenta exponencialmente a cada ciclo (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

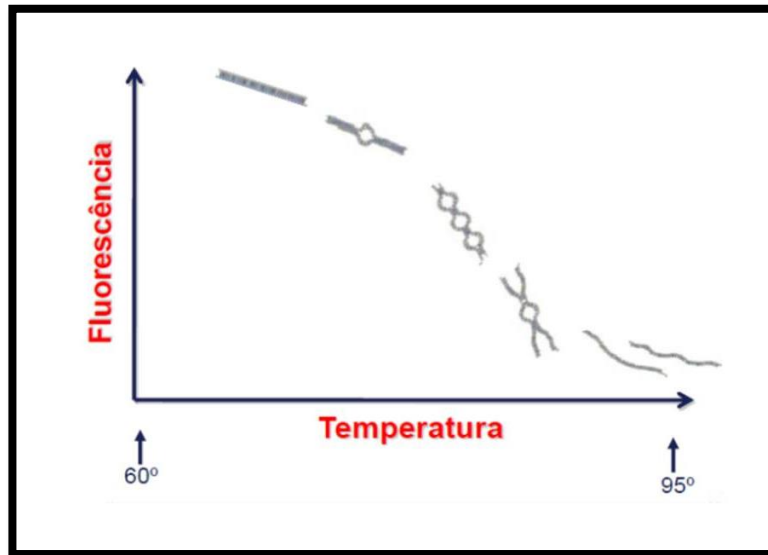
O desenvolvimento de métodos automatizados baseados em compostos fluorescentes tornou possível a eliminação do processamento pós-PCR para análises dos produtos resultantes da amplificação, sendo a PCR em tempo real (qPCR) o método mais empregado para detecção e quantificação dos OGM em alimentos. Essa técnica monitora a reação durante a sua ocorrência em tempo real. A quantidade de produto amplificado durante a reação é estimada diretamente pela emissão da fluorescência. 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 (AHMED, 2002).

A especificidade da técnica de PCR em tempo real depende tanto do sistema químico utilizado para gerar o sinal fluorescente, como do instrumento usado para monitorar o sinal. Vários sistemas químicos já foram desenvolvidos sendo que os mais utilizados são as sondas de hibridização TaqMan® e o SYBR® Green (GÄSPARĪC et al., 2010). No sistema TaqMan®, pequenos oligonucleotídeos denominados de sondas de hidrólise são marcados com corantes fluorescentes que hibridizam dentro da região delimitada pelos iniciadores aumentando assim a especificidade da reação de PCR. As sondas podem ser marcadas com diferentes corantes “reporter”, possibilitando a detecção de mais de uma sequência amplificada numa mesma reação, a reação de multiplex PCR.

O sistema SYBR[®] Green é um dos corantes intercalantes mais utilizados e se liga indiscriminadamente à dupla fita de DNA, não se ligando à fita simples. Como consequência dessa ligação, a fluorescência é aumentada de 800 até 1000 vezes. No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR[®]Green, onde as moléculas não-ligadas do SYBR[®] Green apresentam fluorescência muito reduzida produzindo um sinal ínfimo. À medida que a reação de PCR vai ocorrendo, o aumento da quantidade do DNA em fita dupla, ou seja, os produtos de PCR sintetizados acarretam em um aumento gradual do sinal fluorescente captada pelo sistema ótico do equipamento (WEIGHARDT, 2004).

A principal limitação dessa metodologia está relacionada à inespecificidade da ligação do corante, já que toda fita dupla de DNA formada, incluindo os produtos não específicos e os artefatos de dímeros de iniciadores, serão marcados e a fluorescência captada. Para contornar essa limitação, deve ser incluída uma análise através da curva de dissociação térmica. Essa curva é marcada pelo aumento gradual da temperatura e conseqüentemente pela diminuição da intensidade de fluorescência que é avaliada ao longo do tempo (figura 4). Cada produto de PCR, ou seja, cada sequência de DNA apresentará uma temperatura específica onde apenas metade das moléculas estará ligada, ou seja, uma temperatura de melting específica (T_m) (GÄSPARĪC et al., 2010). Sequências maiores e mais ricas em bases guanina e citosina apresentam maiores valores de T_m , dessa forma é possível inferir sobre a especificidade da reação.

Figura 4. Curva de dissociação térmica mostrando os diferentes estados de complementariedade das sequências de DNA e relação com a intensidade de sinal fluorescente de SYBR® Green.



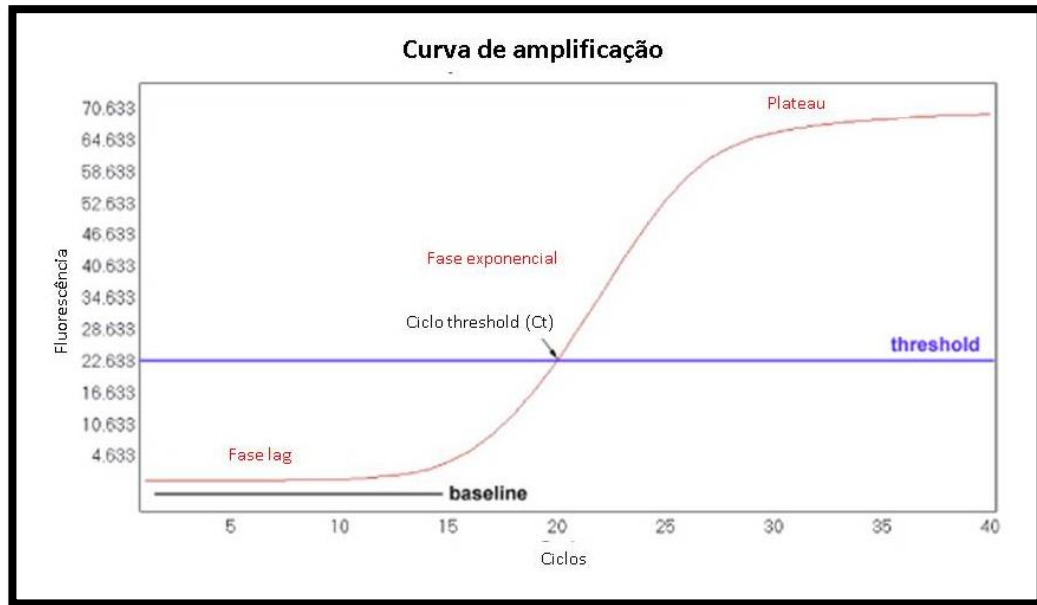
Fonte: <http://www.gene-quantification.de/hrm-path-utah.gif> (modificada).

Na PCR em tempo real, diferentemente da PCR convencional (end-point), a detecção e a quantificação não são avaliadas no estágio final de reação, e sim na fase exponencial onde a eficiência da reação é maior, permitindo avaliar com mais robustez a concentração inicial do DNA alvo para cada amostra (GÄSPARĪC et al., 2010).

As fases da amplificação da PCR podem ser definidas em três fases distintas: i) *lag* ou de início que antecede a emissão de sinal fluorescente, ii) exponencial ou log que é a mais importante para esta análise, pois evidencia o aumento do sinal fluorescente e iii) *plateau*, onde não se percebe aumento do sinal fluorescente gerado. É necessário que seja estabelecida uma linha *threshold* que é calculada a partir da média dos sinais fluorescentes medidos. Na prática, a linha *threshold* é posicionada pelo equipamento e deve ser corrigida pelo usuário, posicionada no meio da fase exponencial e no ponto em que as réplicas sejam mais coincidentes. Existem formas e modelos diferentes para posicionar esse nível arbitrário de fluorescência que depois de estabelecido deve ser utilizado nas análises realizadas com o mesmo sistema de detecção (alvo, iniciadores e sonda). O ciclo *threshold* (Ct) é caracterizado pelo ciclo da reação de PCR em que a curva de amplificação cruza a

linha *threshold*. Quanto maior a quantidade inicial do alvo, mais cedo ocorre um aumento significativo da fluorescência e menor será o valor de Ct (figura 5) (CONCEIÇÃO et al, 2004).

Figura 5 – Curva de amplificação por PCR em tempo real.



Fonte: <http://www.highveld.com/pcr/real-time-pcr-quantification-analysis.htm>.

Para quantificação é necessário que sejam incluídas curvas-padrão contendo amostras com conteúdo definido de forma que os Ct das amostras sejam comparáveis ao Ct dos diferentes pontos da curva-padrão.

O conteúdo de OGM em uma amostra, na quantificação por PCR em tempo real, é expresso pela quantidade de material geneticamente modificado em relação à quantidade de um gene ou de uma sequência endógena (WEIGARTH et al, 2004). No caso de alimentos processados e constituídos por vários ingredientes, outros fatores vão influenciar ainda mais na interpretação dos resultados das análises quantitativas.

2) JUSTIFICATIVA

A introdução dos OGM na produção e comercialização de alimentos tem gerado um intenso debate em diversas sociedades acerca dos riscos e da necessidade de fornecer informações ao consumidor quanto a presença destes nos alimentos. Assim, as técnicas de detecção de alimentos transgênicos vêm sendo aprimoradas, principalmente na Europa, a fim de identificar eventos de OGM, ou eventuais contaminações na cadeia produtiva.

A tradicional estratégia de detecção de OGM em alimentos consiste, na detecção de dois elementos genéticos mais comumente utilizados nas construções (o promotor P35S extraído do vírus do mosaico da couve-flor e o terminador T-nos extraído da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*) - seguida da identificação / quantificação do evento específico. No entanto, esta estratégia encontra limitações devido ao constante aumento do número de eventos e à diversidade das novas construções e complexidade dos novos eventos que vêm sendo desenvolvidos e lançados no mercado mundial. Portanto, novas abordagens analíticas têm sido apresentadas, como a seleção de novos elementos genéticos de triagem que possibilitem o direcionamento das análises subsequentes de quantificação com diminuição do custo total da análise; o uso de métodos de alta eficiência para detecção de múltiplos alvos; e modelos matemáticos que convertam os resultados analíticos em indicação de potenciais OGM nas amostras.

As metodologias de detecção e as estratégias de investigação influenciaram fortemente o potencial de implementação e manutenção da legislação específica e da rotulagem. Contudo a detecção e a quantificação de OGM têm sido de grande importância no comércio brasileiro e internacional, especialmente em países que permitem tanto a rotulagem para a presença como para a ausência de transgênicos.

Diante das questões apresentadas um dos desafios dos órgãos de Vigilância Sanitária é o de associar o direito do consumidor às informações confiáveis acerca dos produtos 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 diversidade de tipos de alimentos existentes em acordo com o Decreto nº 4.680 de 24/04/2003.

3) OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Implantar um método de triagem de OGM por SYBR® Green utilizando vários iniciadores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o DNA dos materiais de referência certificados (MRC) e das amostras dos alimentos
- Avaliar a concentração e pureza do DNA dos materiais de referência certificados (MRC) e das amostras por espectrofotometria.
- Avaliar a especificidade dos iniciadores utilizados nas análises de triagem, por PCR convencional, incluindo as sequências dos genes endógenos de soja e milho.
- Avaliar a especificidade dos iniciadores utilizados nas análises de triagem, por PCR em tempo real com SYBR® Green, incluindo as sequências endógenas.
- Estabelecer as temperaturas de dissociação de cada sequência (T_m).
- Estabelecer os Limites de Detecção (LOD) de cada alvo utilizado na triagem por PCR em tempo real.
- Detectar as sequências de triagem nas amostras de alimentos.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS DE REFERÊNCIA

Foram utilizados os materiais de referência certificados (MRC) produzidos pelo “European Reference Materials” (ERM) e “American Oil Chemists Society” (AOCS), constituídos por farinhas, na forma de pó seco, contendo percentuais distintos de eventos de soja e de milho geneticamente modificados. Os padrões de milho são: ERM BF 411 contendo milho Bt176; ERM BF 412 contendo milho Bt11; ERM BF 413 contendo milho MON810; ERM BF 414 contendo milho GA21; EMR BF 415 contendo milho NK603; ERM BF 418 contendo milho TC1507; AOCS 0906E contendo milho MON89034; AOCS 1208A contendo milho MIR162; AOCS 0406D contendo milho MON88017 e AOCS 0607A contendo milho MIR604. Também foi utilizado Material de Referência de soja ERM BF 410 contendo diferentes concentrações de soja RR; EMR BF 432 contendo soja DAS 68416-4; AOCS 0911C contendo soja CV127; AOCS 0809A contendo soja MON87701 e AOCS 0906B contendo soja MON89788-2.

4.2 AMOSTRAS

Todas as amostras de alimentos contendo soja e milho, compreendendo diferentes marcas e escolhidas aleatoriamente em estabelecimentos comerciais, foram coletadas nos anos de 2015 e 2016, e catalogadas no setor de amostras do INCQS para posterior análise de detecção de OGM por PCR em tempo real com o SYBR® Green. Foi analisado um total de 10 amostras com variados graus de processamento do alimento como farinhas, floculados e granulados. Dentre essas 10 amostras, 2 eram de fubá, 1 de curau, 1 de flocos de milho, 1 biscoito de milho, 1 de proteína de soja, 1 de extrato de soja, 1 de soja em grão, 1 de farinha de soja e 1 de fibra de soja.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O peso das amostras de alimentos contendo soja e milho variou entre 500 g a 1 Kg. As amostras foram retiradas das suas embalagens originais, transferidas para

sacos plásticos de amostras (60 cm X 40 cm) onde foram homogeneizadas e identificadas com o nome do produto, fabricante e data de abertura da embalagem. A amostra contendo soja em grão foi moída no moinho analítico (M20-IKA) até a obtenção de um pó fino antes de ser transferida para o saco plástico de amostras. Parte do conteúdo das amostras foi retirada do saco plástico, depois da homogeneização e transferida para um tubo de 50 mL, identificada e armazenada na geladeira.

Foram utilizadas 100 mg das amostras de fibra de soja, farinha de soja, extrato de soja, proteína de soja, soja em grão e dos MRC de soja e milho. Nas amostras de curau de milho, fubá de milho, fubarina e biscoito de milho foram utilizadas 200 mg. Duas réplicas de cada amostra foram submetidas a extração de DNA.

4.4 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Neste trabalho foi utilizado o método CTAB para extração de DNA genômico. Ele envolve basicamente a extração e precipitação do DNA e outros polímeros como polissacarídeos e polifenóis pelo detergente aniônico brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) e posterior purificação do DNA com clorofórmio/isopropanol e etanol 70% (LIPP et al,1999).

As porções de 100 mg a 200 mg foram transferidas para tubos de polipropileno estéreis de 1,5 mL, além de um tubo para o controle da extração, seguido pela hidratação com 200 µL de água deionizada estéril, homogeneizados em agitador de tubos, e extraídos com 800 µL de detergente CTAB (20 g CTAB/L; 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl; 20 mM EDTA, pH 8,0), adicionados de 20 µL proteinase K (20 mg/mL). Os tubos foram aquecidos a 65°C em banho seco durante 90 minutos, sendo homogeneizados a cada 15 minutos, e posteriormente adicionados de 20 µL RNase (20 mg/mL) e prolongada a incubação por mais 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13000 xg por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos contendo 500 µL de clorofórmio, homogeneizados em agitador de tubos por 30 segundos e centrifugados a 13000 xg por 10 minutos. 500 µL dos sobrenadantes foram transferidos para tubos contendo 500 µL de clorofórmio e novamente homogeneizados e centrifugados a 13000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados duas vezes o seu

volume de tampão de precipitação com CTAB (5 g CTAB/L; 40 mM NaCl, pH 8,0) e incubado à temperatura ambiente durante 60 minutos. Após a centrifugação a 13000 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 350 µL NaCl (1,2 M) e adicionado de 350 µL de clorofórmio. Após a centrifugação a 13000 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi tratado com 0,6x o volume de isopropanol gelado e incubado por 1h a -20°C. Após esse período, foi centrifugado a 13000 xg por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi adicionado de 500 µL de etanol a 70% e agitado cuidadosamente e centrifugado a 13000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido à temperatura ambiente para evaporar resíduos de álcoois e por fim, adicionados 50 µL de água deionizada. O material foi mantido de 2-8 °C no refrigerador por no máximo 15 dias ou estocados a -20°C por períodos maiores.

4.5 DOSAGEM DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS E DOS MATERIAIS DE REFERÊNCIA

Foi realizada a dosagem e avaliação da qualidade do DNA por espectrofotômetro, utilizando o equipamento GeneQuant *pro* spectrophotometer (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) que determina a concentração a 260nm e a pureza do DNA através das medidas de absorbância em 230nm, 260nm, 280nm, utilizando cubetas de quartzo. As preparações de DNA puras devem estar entre as proporções $A_{260/230} > 2.0$ e $A_{260/280}$ entre 1.8 e 2.0.

4.6 AMPLIFICAÇÃO POR PCR CONVENCIONAL

A PCR convencional foi utilizada para avaliar a especificidade dos iniciadores utilizados nas análises de triagem, o promotor do vírus do mosaico da couve-flor P-35S, o terminador T-nos da *A. tumefaciens*, a sequência da junção do peptídeo trânsito (CTP2) de *Arabidopsis thaliana* e o gene epsps da cepa CP4 de *A. tumefaciens*, a sequência do gene *BAR* de *Streptomyces hygroscopicus* e a sequência do gene *PAT* de *Streptomyces viridochromeogenes* e os endógenos de soja (lectina) e de milho (ADH).

A reação da PCR foi realizada em 25 μ L contendo tampão 1X (10 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl), 1U da enzima *Taq*DNA polimerase, 160 μ M dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,24 μ M de cada iniciador. Foram utilizados 2 μ L do DNA (50 ng/ml). Após a preparação da PCR, os tubos foram colocados no termociclador Amplitherm Thermal Cyclers. O programa utilizado para os iniciadores T-nos, ADH, Lectina, CTP-2, PAT e BAR foi: desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C seguida por 40 ciclos de desnaturação durante 1 minuto a 94°C, anelamento durante 1 minuto a 60°C, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final de 3 minutos a 72°C. O programa utilizado para o iniciador P35S foi: desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C seguida por 40 ciclos de desnaturação durante 40 segundos a 94°C, anelamento durante 40 segundos a 58°C, extensão a 72°C por 40 segundos e extensão final de 3 minutos a 72°C. Os alvos, a sequência dos iniciadores e tamanho dos amplicons estão na tabela 1.

4.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A visualização dos produtos da amplificação dos alvos endógenos (ADH e lectina) e das sequências de triagem foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 2% (p/v) contendo 3,0 μ L de brometo de etídio (Promega), a uma voltagem constante (80 V durante 15 minutos e 100 V para 90 minutos) 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 (*ImageQuant* 300, General Electric-GE Healthcare).

4.8 AMPLIFICAÇÃO POR qPCR SYBR® GREEN

A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no equipamento ABI 7500 FAST Detection System (Applied Biosystems) com SYBR® Green. Os alvos, oligonucleotídeos iniciadores, suas sequências e tamanho dos produtos estão descritos na tabela 1:

Tabela 1: Alvos, nomes dos iniciadores, sequências e tamanhos dos produtos de amplificação:

Alvo	Iniciador	Sequência	Tamanho (pb)	Referência
Lectina	sltm1	5' aaccggtagcgttgccag 3'	81	MBONGOL O-MBELLA, et al, 2011
	sltm2	5' agcccatctgcaagccttt 3'		
ADH	ADH_altFwd	5'tctcttcctccttagagctaccacta3'	83	MBONGOL O-MBELLA et al, 2011
	ADH_alt Rev	5'aatcgatccaaagcgagatga 3'		
P-35S	35S_N3Fwd	5'aaagcaagtggattgatgtgata3'	75	BARDAU- PIEDNOIR et al, 2010
	35S_N3 Rev	5'gggtcttgcaaggatagtg 3'		
T-nos	tNOS_NN_Fw	5'gattagagtcccgaattatacatttaa3'	69	BARDAU- PIEDNOIR et al, 2010
	d tNOS D Rev	5'ttatcctagkttgcgcgctatattt 3'		
CTP2- EPSPS	GT73-TmF	5'gggatgacgtaattggctctg3'	88	HUBER et al, 2013
	GT73-TmR	5'ggctgcttgaccggtgaag 3'		
PAT	Pat-PatFwd	5'ccgcggtttgtgatatcgtt3'	109	BARDAU- PIEDNOIR et al, 2012
	Pat-Pat Rev	5'tcttgaacctcttagatcatcaa 3'		
BAR	Pat-BarFwd	5'cgtaaccactacatcgagacaa3'	69	BARDAU- PIEDNOIR et al, 2012
	Pat-Bar Rev	5'gtccactcctgcggttctt 3'		

Os iniciadores foram testados com os DNA extraídos dos MRC de milho Bt11 0% e 1%, Bt176 0% e 1%, MIR 604, MIR 162, T25, MON88017 e MON89034; e dos MRC de soja GTS 40-3-2 (RR 0% e RR 1%), MON87701, MON89788 e CV127. A reação foi realizada em 25 µL contendo SYBR® Green PCR Master Mix 1X e 0,24 µM de cada iniciador e 5 µL de DNA (20 ng/µL). A termociclagem foi de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 10 minutos, amplificações a 95°C por 15 segundos e

anelamento a 60°C por 60 segundos, e as curvas de dissociação foram realizadas de acordo com o fabricante do equipamento Applied Biosystems 7500 modelo Fast.

4.9 DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO (LOD)

Os limites de detecção (LOD) de cada alvo foram avaliados experimentalmente através de diluições sucessivas dos MRC dos eventos listados abaixo, calculadas através do peso dos genomas de milho e soja. A quantidade de DNA de cada ponto da curva de diluição, tanto para milho quanto para soja, foi de aproximadamente 100 ng de DNA em 25 µL de reação de qPCR com o SYBR® Green.

A quantidade em picogramas de DNA de uma única cópia de genoma (1C) foi baseada nos valores estabelecidos pelo banco de dados “The Royal Botanic Garden” (BENETT et al, 2004), que no caso da soja e do milho são 1,13 pg e 2,73 pg, respectivamente. Os MRC utilizados para estabelecer os limites de detecção foram:

1. Soja RR 10% contendo 8850, 888, 88, 44, 22 e 11 cópias dos alvos T-nos, P-35S e lectina.
2. Soja DAS 68416-4 10% contendo 8850, 880, 88, 44, 22 e 11 cópias do alvo PAT.
3. Soja MON 89788-2 contendo 8850, 880, 88, 44 e 22 cópias do alvo CTP-2.
4. Milho MON88017 10% contendo 36000, 7200, 1440, 300, 60, 20 e 10 cópias do alvo ADH.
5. Milho MON88017 10% contendo 3600, 3600, 360, 72, 18 e 6 cópias dos alvos T-nos e P-35S.
6. Milho TC 1507 10% contendo 3600, 1200, 400, 130, 44 e 22 cópias do alvo PAT.
7. Milho NK 603 5% contendo 1800, 600, 200, 66, 22 e 11 cópias do alvo CTP-2.
8. Milho Bt 176 5% contendo 1800, 600, 200, 66, 22 e 11 cópias do alvo BAR.

4.10 DETECÇÃO PRESUNTIVA DE OGM NAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS

As soluções de DNA das amostras de alimentos foram diluídas a uma concentração de 20 ng/µL e utilizados na detecção de OGM pelo método qPCR

SYBR® Green. A reação foi realizada em 25 µL contendo SYBR® Green PCR Master Mix 1X e 0,24 µM de cada iniciador e 5 µL de DNA (20 ng/µL). A termociclagem foi de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 10 minutos, ampliações a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 60 segundos, e as curvas de dissociação foram realizadas de acordo com o fabricante do equipamento Applied Biosystems 7500 modelo Fast.

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E PUREZA DOS DNA EXTRAÍDOS

Os valores médios das concentrações de DNA e da relação de A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} dos MRC e das amostras são mostrados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Concentração e pureza do DNA extraído dos MRC de soja e milho

MRC	Concentração (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Bt11 0%	159	2,0	2,21
Bt11 1%	150	1,97	1,85
Bt176 0%	137	2,01	2,85
Bt176 1%	142	2,02	2,49
MIR604	346	2,04	2,72
MIR162	500	1,91	2,43
T25	273	1,87	2,62
MON88017	454	1,98	2,37
MON89034	464	2,05	2,69
Soja RR 0%	421	1,96	1,62
Soja RR 1%	347	1,93	1,48
MON89788	252	1,90	1,40
CV127	629	1,88	1,13
MON87701	194	1,99	1,61

Nas extrações de DNA dos MRC foi observado que a relação A_{260}/A_{280} apresentou um produto de boa qualidade visto que os valores se encontravam entre 1,8 e 2,0. Já na relação A_{260}/A_{230} os valores dos MRC Bt11 1%, soja RR 0% e 1%, MON89788, CV127 e MON87701 ficaram inferiores a 2,0.

Tabela 3: Concentração e pureza dos DNA extraídos das amostras de soja e milho:

Amostra	Concentração (ng/μL)	A₂₆₀/A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₃₀
Fibra de soja	300	1,91	4,27
Farinha de soja	530	1,88	2,39
Extrato de soja	385	1,87	1,07
Proteína de soja	140	1,90	3,0
Soja em grão	34	2,0	1,89
Fubá de milho	90	2,0	2,14
Fubá de milho pré-cozido	56	1,51	0
Curau de milho	-	-	-
Fubarina	71	1,54	0
Biscoito de milho	28	1,82	2,73

As preparações de DNA puras devem apresentar proporções $A_{260/230} > 2.0$ e $A_{260/280}$ entre 1.8 e 2.0. Uma absorbância inferior a 2,0 para a razão entre A_{260}/A_{230} pode indicar a presença de polissacarídeos, sais, lipídeos restos fenólicos e guanidina no DNA. Já valores abaixo de 1,8 ou acima de 2,0 para a razão A_{260}/A_{280} podem indicar presença de proteínas, marcadas pelo anel benzênico do triptofano, que também absorvem nesse mesmo comprimento de onda, interferindo na reação de PCR (CORBISIER, P. et al.2007).

Pelos resultados de A_{260}/A_{280} observados nas extrações das amostras verificou-se a obtenção de um DNA de boa qualidade. Apenas o fubá de milho pré-cozido e a fubarina apresentaram valores médios abaixo de 1,8 indicando vestígios de impurezas, como proteínas, que ainda podem estar presentes.

A relação A_{260}/A_{230} das amostras de fibra de soja, farinha de soja, proteína de soja, fubá de milho e biscoito de milho apresentaram valores acima de 2, ou seja, apresentando uma boa qualidade de DNA. Já nas amostras de extrato de soja, soja em grão, fubá de milho pré-cozido e fubarina foram observados valores inferiores a 2,0 demonstrando a possível presença de substâncias inibidoras nessas amostras.

As concentrações de DNA das amostras em análise foram adequadas para utilização na PCR qualitativa e PCR em tempo real, pois mesmo não atingindo a quantidade recomendada (30 a 40 ng) foram testadas empiricamente, já que as

técnicas são sensíveis o suficiente para detectar diferentes concentrações de DNA. A única exceção foi a amostra de curau que não apresentou leitura espectrofotométrica, estando, provavelmente, abaixo do limite de detecção do método de doseamento de DNA. Mesmo assim essa amostra foi utilizada na amplificação por qPCR., demonstrando a alta sensibilidade desta metodologia.

Portanto, o método CTAB foi adequado na extração de DNA de quantidade e qualidade aceitável para a maioria das análises de detecção de organismos geneticamente modificados nas amostras estudadas. Este método se mostrou eficaz no isolamento de DNA de alimentos processados (Di BERNARDO et al., 2007, BRANQUINHO et al, 2012), e 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.

5.2 RESULTADOS DA ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES POR PCR CONVENCIONAL

Os iniciadores foram avaliados primeiramente por PCR convencional frente a alguns MRC de soja e milho. Segundo descrito na literatura os MRC de soja e milho devem amplificar somente as seguintes sequências: soja RR 1% - lectina, T-nos, e P-35S; milho GA21 1% - ADH e T-nos; o milho Bt11 1% - ADH, T-nos, P-35S e PAT; o milho Bt176 1% - ADH, P-35S e BAR; e o milho MON810 1% - ADH e P-35S (BARDAU-PIEDNOIR et al, 2010; HUBER et al, 2013; MBONGOLO-MBELLA et al, 2011).

Os resultados demonstraram que os iniciadores amplificaram as sequências produzindo amplicons de tamanhos esperados, como mostrado na tabela 4 e figura 6.

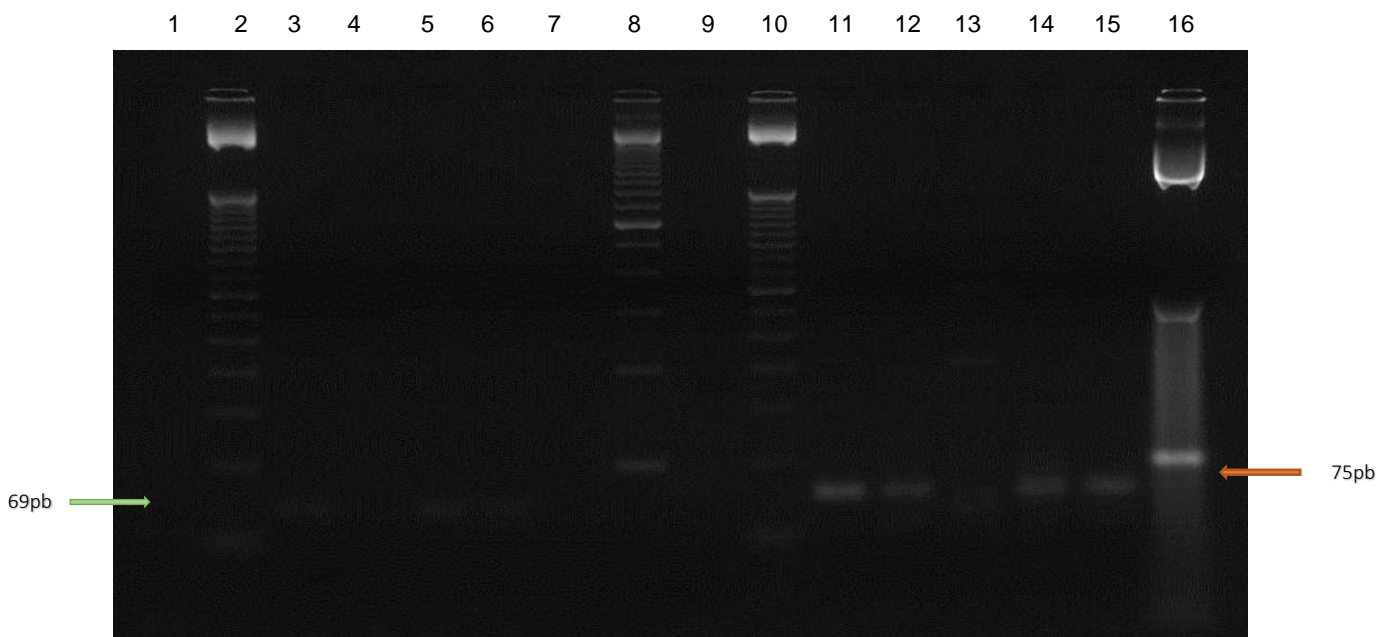
Tabela 4: Resultado da amplificação dos produtos por PCR convencional

MRC	Iniciadores/Tamanho do amplicon (pb)						
	Sltm (81)	CTP-2 (88)	T-nos (69)	P-35S (75)	ADH (83)	PAT (109)	BAR (69)
RR 1%	+	-	+	+	-	-	-
GA21 1%	-	-	+	-	+	-	-
Bt11 1%	-	-	+	+	+	+	-
Bt176 1%	-	-	-	+	+	-	+
MON810 1%	-	-	-	+	+	-	-

Legenda: (+) = presença do amplicon e (-) = ausência do amplicon

A figura abaixo mostra um dos géis de agarose, exemplificando a amplificação positiva dos alvos T-nos e P35S nos MRC de soja RR e milhos MON810, GA21, Bt11 e Bt176.

Figura 6 – Gel de agarose da amplificação do iniciador T-nos e P35S com soja RR 1% (pista 3 e 11), com milho MON 810 1% (pista 4 e 12), milho GA21 1% (pistas 5 e 13), milho Bt11 1% (pistas 6 e 14) e milho Bt176 1% (pistas 7 e 15). Peso molecular de 50 pb (pistas 2 e 10) e de 100 pb (pistas 8 e 16).



Todos os alvos foram amplificados com êxito e apresentaram os tamanhos de produtos esperados.

5.3 RESULTADOS DA ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES POR qPCR SYBR® GREEN

A especificidade dos iniciadores foi testada por qPCR frente ao MRC de soja RR (0% e 10%), milho MON88017, milho MON89034, soja MON87701, soja MON89788, soja CV127, milho T25, milho NK603, milho MIR162, milho MIR604, milho Bt176, milho Bt11 (0% e 1%). Foram consideradas como positivas as amplificações anteriores ao Ct 35 e que apresentaram temperaturas de dissociação semelhantes às temperaturas descritas na literatura. Esses resultados estão descritos, resumidamente, na tabela 5.

Tabela 5: Especificidade dos iniciadores por qPCR SYBR® Green com as respectivas temperaturas de dissociação.

MRC	Iniciadores/Temperatura de dissociação – Tm (°C)						
	ADH	Slm	P-35S	T-nos	CTP-2	PAT	BAR
	76,5	80,1	76,8	72,2	79,5	77,4	80,3
Bt11 0%	+	-	-	-	-	-	-
Bt11 1%	+	-	+	+	-	+	-
Bt176	+	-	+	-	-	-	+
MIR604	+	-	-	+	-	-	-
MIR162	+	-	-	+	-	-	-
NK603	+	-	+	+	+	-	-
T25	+	-	+	-	-	+	-
MON88017	+	-	+	+	+	-	-
MON89034	+	-	+	+	-	-	-
RR 0%	-	+	-	-	-	-	-
RR 1%	-	+	+	+	-	-	-
MON87701	-	+	-	-	+	-	-
MON89788	-	+	-	-	+	-	-
CV127	-	+	-	-	-	-	-

Legenda: (+) = presença de amplificação e (-) = ausência de amplificação.

Os resultados deste trabalho confirmaram que os iniciadores ADH, Slm, P-35S, T-nos, CTP-2, PAT e BAR, conforme descrito na literatura (BARDAU-PIEDNOIR et al, 2010; HUBER et al, 2013; MBONGOLO-MBELLA, et al, 2011) foram eficientes na detecção dos elementos de triagem. Esses resultados foram alcançados tanto por PCR convencional quanto em tempo real utilizando SYBR® Green. Os MRC serviram para confirmar a presença ou ausência dos elementos de triagem e dirimir quaisquer dúvidas sobre a especificidade dos ensaios.

5.4 RESULTADOS DO LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) DOS ALVOS DE TRIAGEM POR qPCR SYBR® GREEN

Os limites de detecção foram estimados como o menor número de cópias que amplificou positivamente em todas as réplicas das curvas-padrão feitas pelas diluições dos MRC. Estes limites ficaram em torno de 10 e 20 cópias nos três diferentes eventos de soja (RR 1%, DAS 44406-6, MON89788-2) e nos quatro eventos de milho (MON88017, TC1507, NK603, Bt176). Os resultados da tabela 6 mostram os limites estabelecidos por alvo de MRC testado.

Tabela 6. Valores dos limites de detecção dos alvos nos MRC de soja e milho

ALVO	MATRIZ dos MRC	LOD
Lectina	soja RR	21 cp
ADH	milho 88017	10 cp
T-nos	milho 88017	18 cp
	soja RR	22 cp
P35S	soja RR	22 cp
	milho 88017	18 cp
PAT	soja DAS 44406-6	11 cp
	milho TC 1507	22 cp
CTP-2	milho NK603	11 cp
	soja MON89788-2	22 cp
BAR	milho Bt176	11 cp

Legenda: cp = cópias

Dessa maneira foram testados todos os elementos de triagem empregados no estudo nas duas matrizes analisadas (soja e milho), à exceção do alvo BAR que não está presente em cultivares de soja conhecidos.

Levando-se em conta que 100 ng de DNA correspondem a aproximadamente 88500 e 36500 cópias de genoma de soja e milho respectivamente, e que os limites encontrados nesse trabalho ficaram em torno de 10-20 cópias, podemos considerar que a metodologia empregada é capaz de detectar entre 0,01% e 0,05% de material geneticamente modificado presente nos MRC de soja e milho, estando bem abaixo do limite de 1% estabelecido no decreto nº 4.680 em relação a rotulagem obrigatória dos alimentos transgênicos.

Estes limites encontram-se um pouco acima dos valores encontrados em laboratórios de análise de OGM na Europa (SCHOLTENS et al, 2013; VAN DE

BULCKE et al, 2010). No entanto, mais análises são necessárias para o real estabelecimento desse limite e outros parâmetros importantes na análise de produtos.

5.5 DETECÇÃO PRESUNTIVA DE OGM DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Foram analisadas 10 amostras de alimentos sendo 05 de matriz de soja e 05 de matriz milho (tabela 7). As soluções de DNA extraídas das amostras foram submetidas à PCR em tempo real frente aos iniciadores sltm, ADH, P35S, T-nos, PAT, BAR, e CTP-2.

As amostras foram consideradas positivas na amplificação dos diferentes alvos quando os valores de Ct ficaram abaixo de 35 e os valores das temperaturas de dissociação (T_m) corresponderam àqueles obtidos nas amplificações dos MRC, aceitando-se variações de até $\pm 1^\circ\text{C}$. As figuras 7 e 8 mostram a curva de amplificação e a curva de dissociação, respectivamente, dos iniciadores sltm, P35S, T-nos e CTP-2 presentes na amostra de farinha de soja.

Figura 7: Curva de amplificação da qPCR SYBR® Green da amostra farinha de soja mostrando a amplificação dos alvos sltm, P35S, T-nos e CTP-2.

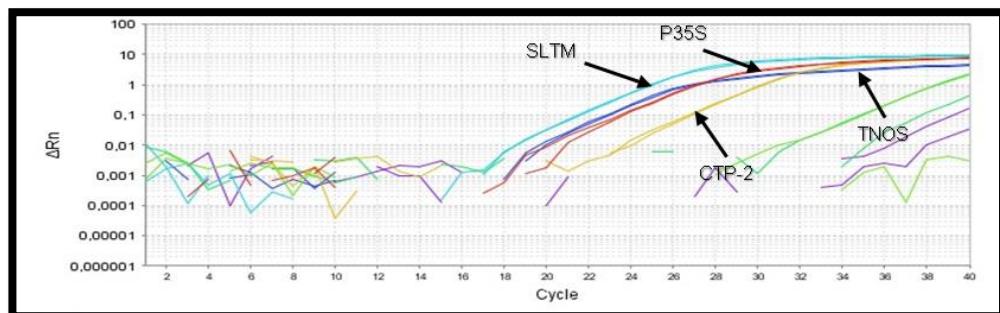
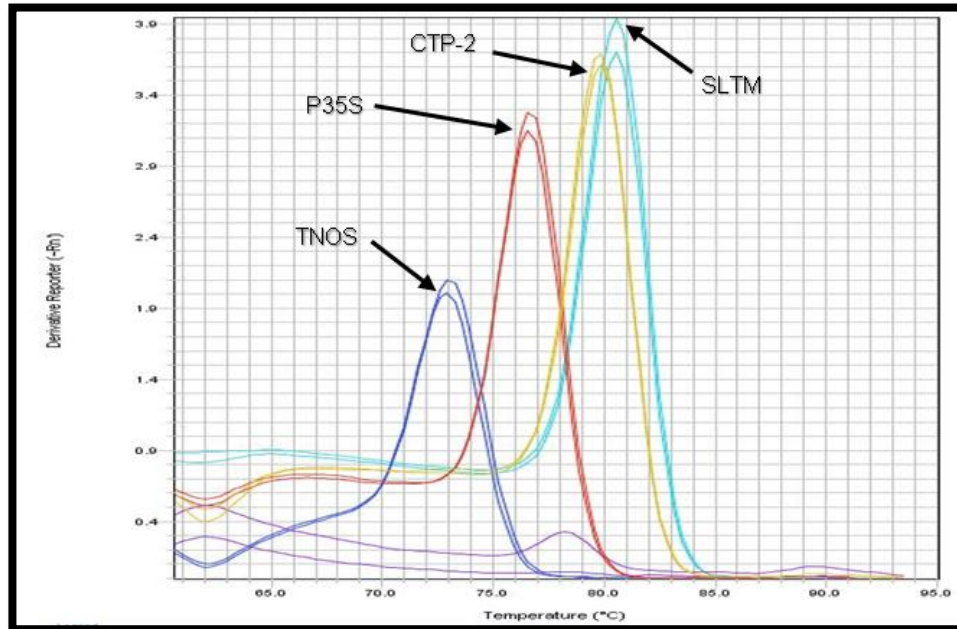


Figura 8: Curva de dissociação dos alvos sltm (80,1°C), P35S (76,8°C, T-nos (72,2°C) e CTP-2 (79,5°C) da qPCR SYBR® Green da amostra de farinha de soja.



As figuras 9 e 10 mostram a curva de amplificação dos iniciadores ADH, P35S, T-nos, PAT, CTP-2 presentes em uma amostra de fubá pré-cozido e a respectiva curva de dissociação.

Figura 9: Curva de amplificação da qPCR SYBR® Green na amostra de fubá pré-cozido mostrando a amplificação dos alvos ADH, P35S, T-nos e CTP-2, PAT.

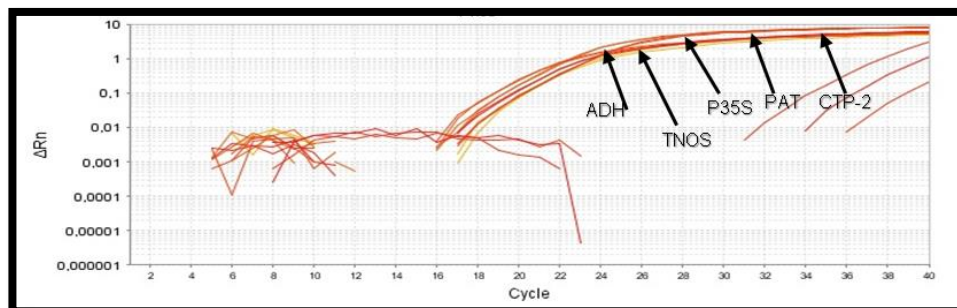
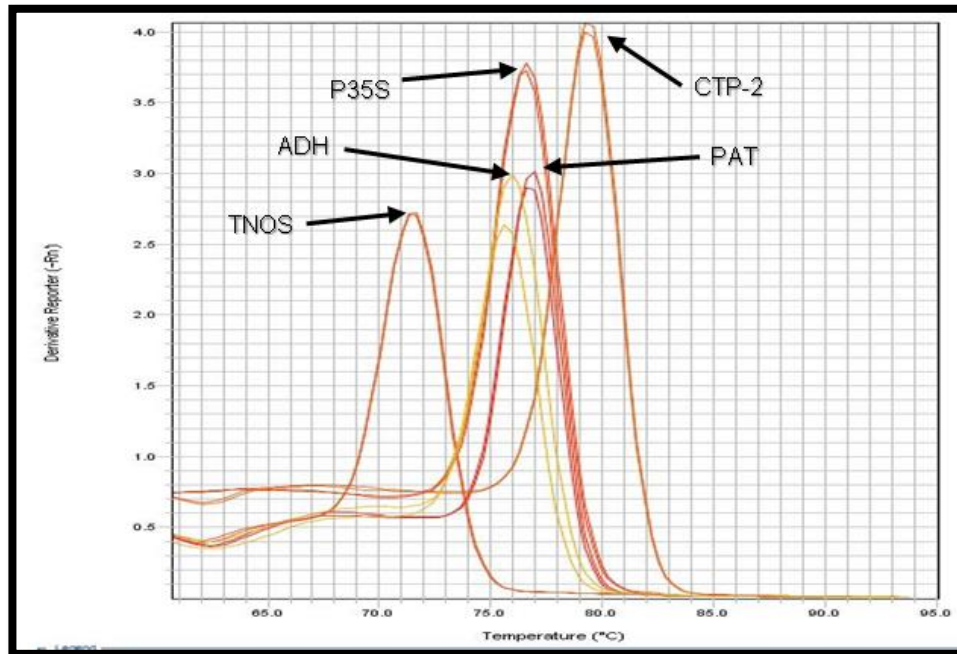


Figura 10: Curva de dissociação dos alvos ADH (76,5°C), P35S (76,8°C), TNOS (72,2°C) e CTP-2 (79,5°C) e PAT (77,4°C) da qPCR SYBR® Green da amostra de fubá pré-cozido.



A tabela 7 apresenta os elementos de triagem presentes em cada amostra assim como cada um dos possíveis eventos que podem constituir essas amostras, baseando-se nos eventos aprovados no Brasil até setembro de 2016. Por fim, pode-se observar, na coluna mais à direita, a relação entre o número de eventos possíveis de serem encontrados nas amostras, que podem ser explicados pela presença ou ausência dos elementos de triagem, e o total de eventos aprovados no Brasil.

Tabela 7: Detecção presuntiva de OGM nas amostras de alimentos

Amostras	Elementos de triagem detectados	Possíveis eventos presentes nas amostras	Eventos possíveis/eventos aprovados
Fibra de soja	Lectina	NÃO GM	-
Farinha de soja	Lectina, P35S, T-nos, CTP2	GTS-40-3-2 , MON87701x MON89788	2/9
Extrato de soja	Lectina	NÃO GM	-
Proteína de soja	Lectina, P35S, T-nos	GTS-40-3-2	1/9
Soja em grão	Lectina	NÃO GM	-
Curau de milho	ADH, P35S, T-nos, PAT, CTP-2	MON810;T25;Bt11;NK603;GA21;Tc1507; MIR162;MON88034;MIR604;MON88017 ; híbridos	28/33
Fubá	ADH, P35S, T-nos, PAT, CTP-2	MON810;T25;Bt11;NK603;GA21;Tc1507; MIR162;MON88034;MIR604;MON88017 ; híbridos	28/33
Fubarina	ADH, P35S, T-nos, PAT, CTP-2	MON810;T25;Bt11;NK603;GA21;Tc1507; MIR162;MON88034;MIR604;MON88017 ; híbridos	28/33
Fubá pré cozido	ADH, P35S, T-nos, PAT, CTP-2	MON810;T25;Bt11;NK603;GA21;Tc1507; MIR162;MON88034;MIR604;MON88017 ; híbridos	28/33
Biscoito de milho	ADH, P35S, T-nos, PAT, CTP-2	MON810;T25;Bt11;NK603;GA21;Tc1507; MIR162;MON88034;MIR604;MON88017 ; híbridos	28/33

Devido ao fato das análises terem sido realizadas em alimentos processados e não em sementes individuais, não se pode determinar se as amostras analisadas possuem associações de eventos simples ou eventos híbridos. Não há como saber, pela metodologia utilizado, se a presença de elementos de triagem é explicada por diferentes grãos transgênicos ou um mesmo grão contendo construções mais complexas.

O método de triagem proposto neste trabalho com os 5 elementos genéticos se mostrou bastante eficaz, na discriminação dos eventos de soja geneticamente modificada presentes nas amostras analisadas. Dos 9 eventos já aprovados no Brasil, o uso dos 5 elementos genéticos identificou presuntivamente 1 evento na

amostra de proteína de soja e 2 possíveis eventos na de farinha de soja, o que reduziu consideravelmente a necessidade de ensaios de identificação posteriores para completar a análise das amostras. Em relação às análises nas amostras de milho, esses mesmos elementos genéticos não foram suficientes para uma boa discriminação dos possíveis eventos, uma vez que dos 33 eventos aprovados, 28 seriam possíveis de estar presentes nas amostras. Uma alternativa para melhorar essa discriminação seria a inclusão de mais elementos de triagem, como por exemplo da endotoxina delta de *Bacillus thuringiensis* (CryIAb), cruciferina (CRU), neomicina fosfotransferase (nptII), promotor da nopalina sintase (PNOS) e o terminador 35S (T-35S) (SCHOLTENS, et al, 2013; VAN DE BULCKE et al, 2010).

6) CONCLUSÕES

O método de extração CTAB se mostrou adequado para a extração de DNA das amostras de farinha de soja, fibra de soja, extrato de soja, proteína de soja, soja em grão, fubá, fubarina, fubá pré-cozido, biscoito de milho, e dos MRC utilizados neste trabalho, fornecendo soluções de DNA de boa qualidade e integridade para as análises de detecção de organismos geneticamente modificados, utilizando os métodos de PCR convencional e PCR em tempo real.

A amplificação pelo método da PCR qualitativo demonstrou que todos os iniciadores estavam amplificando satisfatoriamente e produzindo amplicons dos tamanhos descritos na literatura.

A amplificação pela qPCR demonstrou que todos os iniciadores estavam amplificando adequadamente os alvos presentes nos diferentes MRC e as temperaturas de dissociação estavam próximas às descritas na literatura.

As análises das amostras de soja mostraram que três delas não eram geneticamente modificadas e a detecção presuntiva foi eficiente pois reduziu, nas outras amostras, para 1 e 2 os possíveis eventos do total de 9 aprovados pela CTNBio. Todavia, em todas as amostras de milho analisadas, a detecção presuntiva foi pouco discriminatória pois foram encontrados possíveis 28 eventos do total de 33 aprovados.

A qPCR SYBR[®] Green demonstrou ser uma técnica robusta na amplificação das matrizes de alimentos com alta sensibilidade ficando o Limite de Detecção (LOD) de cada alvo em torno de 10 a 20 cópias que correspondem a, aproximadamente, 0,01% e 0,05% de OGM em termos relativos. Estes valores estão bem abaixo do limite de 1% estabelecido na legislação de rotulagem obrigatória dos alimentos transgênicos (Decreto 4680/2003).

REFERÊNCIAS

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

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

BARDAU-PIEDNOIR E, LIEVENS A, MBONGOLO-MBELLA G, et al. SYBR® Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” an “NOS terminator” elements in food and feed products. **Eur Food Res. Technol**, v. 230, p 383-393, 2010.

BARDAU-PIEDNOIR E, LIEVENS A, VANDERMASSEN E, et al. Four new SYBR® Green qPCR screening methods for the detection of Roundup ready, LibertyLink and CryIAb traits in genetically modified products. **Eur Food Res Technol**, v.234, p.13-23, 2012.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I. J. Plant DNA c-values databases of The Royal Botanic Garden, **Kew**, UK. 2004. Disponível em: <http://www.rbgbkew.org.uk/cval/exhibition/html/homepage.html>. Acesso em: set. 2015.

BORÉM, A.; SANTOS, F.R. Variedades resistentes a herbicidas: legislação e liberação. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS**. v.26, p.165-178, 2015.

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. **Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de controle de qualidade em Saúde**, Rio de Janeiro 2010a.

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

BRANQUINHO, M.R.; GOMES, D.M.V; FERREIRA, R.T.B.; LAWSON-FERREIRA, R.; CARDARELLI-LEITE, P. Detection of genetically modified maize events in Brazilian maize-derived food products. **Food Sci. Technology**, v. 33, n. 3: p 399-403, 2013.

BRASIL. Lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995. Regulamenta os incisos II e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas para o uso das técnicas de engenharia genética e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados, autoriza o Poder Executivo a criar, no âmbito da Presidência da República, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 jan. 1995.

_____. 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. 2003a.

_____, Portaria nº 2.658, de 22 de dezembro de 2003 M.J. Define o símbolo de que trata o art. 2º, § 1º, do Decreto 4.680, de 24 de abril de 2003, na forma do anexo à presente portaria. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 dezembro. 2003b.

_____. Lei nº 11.105, de 24 de Março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de Janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de Agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de Dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 mar. 2005.

CARDARELLI-LEITE, P.; FERREIRA, R.T.B.; BRANQUINHO, M.R. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. **Food Control**, v. 16, p. 859-866, 2005.

CARTER, C. A.; GRUERE, G. P. International Approaches to the Labeling of Genetically Modified Foods. **Agricultural Marketing Resource Center**, v.17, p. 1-6, 2010.

CHAVES, M.M., MAROCO, J.P., & PEREIRA, J.S. Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. **Functional Plant biology**, v. 30, p. 239-264. 2003.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex Principles for the Risk Analysis of Food Derived from Modern Biotechnology**. Rome: WHO; FAO, 2003.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (CTNBIO). **Commercial approvals**. Disponível em: <<http://ctnbio.gov.br>> Acesso em: 2016.

CONCEIÇÃO, F. R. et al. Detecção de organismos geneticamente modificados. **Biossegurança em biotecnologia**. v.42, p. 145-169, 2004.

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. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 3249-3257, .PMid:17407305. <http://dx.doi.org/10.1021/jf062931l>. 2007.

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

DUKE, S.O. et al. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.1, p.340-344, 2003.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: **Embrapa-Cenargen**, p 220. 1998.

FERREIRA, R et al. Soja geneticamente modificada em alimentos contendo farinha e preparados à base de farinha de trigo. Detecção e adequação à legislação de rotulagem. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.3, p. 241-248, 2009.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. Glifosato: alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. [S.l.]: **ACADCOM**, v.3, p 66. 2005.

GÄSPARÍČ, 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.

HUBER I, BLOCK A, SEBAH D, et al. Development and validation of duplex, triplex, and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. **J Agric Food Chem**. v 61, p 10293-10301, 2013.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM groups: 2015**. 20th Anniversary of the Global Commercialization of Biotech Crops (1996 to 2015) and Biotech Crop Highlights in 2015.

KRAMER MG, REDENBAUGH K. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: the FLAVrSAVrtM tomato story. **Euphytica** v.79, n.3, p.7-293, 1994.

LAWASON-FERREIRA, et al. Organismos Geneticamente Modificados em alimentos: desafios metodológicos em função dos avanços tecnológicos e da rotulagem. **Vigil.sanit.debate**. v.3, n.3, p. 25-33, 2015.

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.

MAZZA, R. et al. Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. **Transgenic Research**, v. 14, n. 5, p. 775-784, 2005.

MBONGOLO-MBELLA EG, LIEVENS A, BARDAU-PIEDNOIR E, et al. SYBR® Green methods for detection of endogenous reference genes in commodity crops: a step ahead in combinatory screening of genetically modified crops in food and feed products. **Eur Food Res Technol**. v. 232, n.3, p. 485-496, 2011.

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.

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.

SCHOLTENS, I. et al. Practical Experiences with an Extended Screening Strategy for Genetically Modified Organisms (GMOs) in Real-Life Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v 61, p 9097-9109, 2013.

TOKARNIA, M. **Agência Brasil**. Disponível em:
<<http://www.ebc.com.br/tecnologia/2015/04/para-professor-da-usp-liberacao-do-eucalipto-transgenico-e-um-erro>>. Acesso em: 09 jun. 2016

VAN DEN BULCK, M. et al. A theoretical introduction to Combinatory SYBR Green qPCR Screening, a matrix-based approach for the detection of materials derived from genetically modified plants. **Anal Bioanal Chem**, v 396: p 2113-2123, 2010.

VICTORIA FILHO, R. Estratégias de manejo de plantas daninhas. 3. ed. São Paulo: **ANDEF** v. 3, p.397-464, 2008.

WEIGHARDT, F. Quantitative PCR for the detection of GMOs. In: **The Analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms**. Italy: WHO, v.10, p.10-19, 2004.

YAMAGUCHI, H. et al. Two detection methods of genetically modified maize and the state of its importing to Japan. **Food Control**, v. 14, p. 201-206, 2003.