

**DETECÇÃO DE TRANSGÊNICOS EM ALIMENTOS UTILIZANDO A TÉCNICA
MULTIPLEX-PCR.**

Thadeu Estevam Moreira Maramaldo Costa

Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dr. Victor Augustus Marin
Dra. Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO**DETECÇÃO DE TRANSGÊNICOS EM ALIMENTOS UTILIZANDO A TÉCNICA
MULTIPLEX-PCR.*****Thadeu Estevam Moreira Maramaldo Costa***

Dissertação de mestrado 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 Mestre.

Aprovado:

_____ (Doutora em Ciências - Microbiologia)

Dra. Maria Helena Simões Villas Boas

_____ (Doutora em Ciências – Vigilância Sanitária)

Dra. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki

_____ (Doutora em Ciências - Bioquímica)

Dra. Edna Maria Morais Oliveira

Orientadores: _____

Dr. Victor Augustus Marin

Dra. Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Thadeu Estevam Moreira Maramaldo.

Detecção de transgênicos em alimentos utilizando a técnica multiplex-PCR / Thadeu Estevam Moreira Maramaldo Costa. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2008.

xvi, 113 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008.

Orientadores: Victor Augustus Marin
Paola Cardarelli Leite

1. Organismos Geneticamente Modificados 2. Multiplex-PCR 3. Alimentos. I. Título.

Detection of transgenic in food and feed using multiplex PCR

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. VICTOR AUGUSTUS MARIN, do INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, pelo acolhimento, orientação, incentivo, apoio, compreensão, paciência, confiança e amizade durante a realização deste trabalho.

A Prof. Dra. PAOLA CARDARELLI LEITE, do LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR do DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, pela orientação, incentivo, apoio, compreensão e paciência ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A Prof. Dra. MARIA HELENA SIMÕES VILLAS BOAS, pelo acolhimento, apoio, confiança, compreensão e incentivo para o ingresso no curso pós graduação em Vigilância Sanitária.

A APARECIDA AFFONSO BOLLER e HUMBERTO PINHEIRO DE ARAÚJO, do LABORATÓRIO DE VACINAS BACTERIANAS do DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA do INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, pelo acolhimento, apoio, colaboração, incentivo, paciência e amizade, dentro e fora do período de trabalho.

A RAFAELA MOLEDO DE VASCONCELOS e a MARIANA TAVARES DIAS pelo companheirismo, amizade, apoio, colaboração, confiança e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

A MARIA REGINA BRANQUINHO, RENATA TROTTA BARROSO FERREIRA e a todos do LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR do DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, por todo apoio, colaboração, acolhimento, confiança, incentivo e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

A ISABELLA FERNANDES DELGADO e a todos do DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA, por todo apoio e incentivo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos do LABORATÓRIO DE MICROORGANISMOS DE REFERÊNCIA do DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA pela colaboração e apoio no desenvolvimento do presente trabalho.

A todos dos setores de LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO e de MEIOS DE CULTURA por toda colaboração e apoio técnicos prestados.

Aos meus companheiros de turma: LUDMILA ROSA BERGSTEN, CLARICE LIMA DO CANTO ABREU, CARLOS ROBERTO SOBRINHO DO NASCIMENTO, PRISCILA DA NÓBREGA RITO, VIVIANE MEGA DE ANDRADE ZALFA, FLÁVIA BAPTISTA NOBREGA, MARCUS VINICIUS JUSTO BONFIM, GABRIELLE SALES DE OLIVEIRA, entre outros, pelo apoio, amizade, diversão, compreensão e paciência.

A todos do LABORATÓRIO DE ENTEROVÍRUS do INSTITUTO OSWALDO CRUZ pela colaboração, companheirismo amizade e bons momentos compartilhados.

A todos da COORDENAÇÃO DE PÓS GRADUAÇÃO DO INSTITUTO NACIONAL DO CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE pela colaboração, apoio, compreensão e paciência.

Aos meus eternos amigos PRISCILA CAPRILES GOLIATT, LEONARDO GOLIATT, ROBERTO CALADO DA SILVA, FLÁVIA CANELLAS DE SOUZA MEIRELLES, ANTÔNIO CARLOS MEIRELLES, CRISTIANNE MARTINS MONTEIRO, LEANDRO DA SILVA BARBOSA, EUGÊNIA TERRA GRANADO, MARLIO RODRIGO PINA, pelo apoio, amizade, diversão, compreensão e paciência, também eternos.

AO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE pela oportunidade de colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo de todos estes anos de estudo, permitindo a realização de um sonho, a pesquisa aplicada, visando a saúde da população.

A FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ pela oportunidade e pelo apoio financeiro.

A ALINE PEÇANHA MUZY DIAS do INSTITUTO OSWALDO CRUZ, por toda atenção, afeto, paciência, apoio pessoal, incentivo, amizade, companheirismo, compreensão e colaboração prestados, permitindo um melhor desenvolvimento das atividades realizadas.

A meus pais LUCI SAMPAIO MOREIRA e JOSÉ ESTEVAM MARAMALDO COSTA, que sempre me apoiaram e incentivaram em meus estudos para que eu pudesse ter uma vida honesta e digna.

A DEUS por tudo, principalmente pelas amigadas que pude construir ao longo desses anos no meio acadêmico.

RESUMO

Durante o período de 1996 a 2006, a proporção da área global de lavouras biotecnológicas plantadas por países em desenvolvimento aumentou consistentemente a cada ano. Nos últimos dez anos, mais de 40 países adotaram políticas de rotulagem para alimentos geneticamente modificados, mas as características das regulamentações e seu grau de execução variam enormemente. Os efeitos observados dessas políticas sobre a escolha dos consumidores, a informação para os consumidores, comércio dos alimentos, comércio internacional também variam significativamente. No Brasil, o Decreto nº 4.680/03 regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078/90, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados (OGMs). O cumprimento da legislação que regulamenta a comercialização de alimentos e ingredientes contendo OGMs é totalmente dependente da sensibilidade e confiabilidade dos métodos de detecção e quantificação de OGMs. Entre os métodos existentes, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é o mais aceito, por ser sensível e confiável para detecção de material geneticamente modificado em análises de rotina. A padronização da técnica de PCR multiplex para a detecção de vários transgênicos em produtos alimentícios facilita o monitoramento destes, pois além de diminuir o tempo de diagnóstico, utiliza uma menor quantidade de reagentes, barateando o processo de detecção. No presente estudo, foi utilizada uma duplex PCR para a detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato (Roundup Ready) e uma PCR multiplex para a detecção simultânea de três linhagens de milho transgênico (MON810, Bt11 e Bt176) em amostras de alimentos humano e animal. Foram utilizadas duas metodologias para extração do DNA das amostras: o método CTAB (já utilizado pelo INCQS) e o kit DNeasy[®] Mini. Os resultados obtidos foram comparados ao método padrão (PCR simplex) utilizado pelo INCQS. Das 40 amostras analisadas, 30 foram positivas para a presença de soja Roundup Ready, e quatorze apresentaram positividade simultânea para zeína e algum dos tipos de milhos pesquisados. Dessas, nove foram positivas para o milho MON810, três para o milho Bt11, e cinco para o milho Bt176. O método mostrou ser robusto podendo ser utilizado de forma rotineira na detecção de OGM em alimentos.

ABSTRACT

From 1996 to 2006, the proportion of the global area of biotech crops growing in developing countries has increased consistently. In the last ten years, over 40 countries have adopted policies for the labeling of genetically modified food, but the regulations characteristics and their degree of implementation varies greatly. The effects of these policies on consumer choice and information, on food trade and international trade also vary significantly. In Brazil, the Decree No. 4.680/03 regulates the right to consumers information, provided by Law No. 8078/90, on food and food ingredients intended for human or animal consumption containing or produced from genetically modified organisms (GMOs). Compliance with regulation on the marketing of foods and ingredients containing GMOs is totally dependent on the sensitivity and reliability of methods of detection and quantification of GMOs. Among the existing methods, the polymerase chain reaction (PCR) is the most accepted, sensitive and reliable for the detection of genetically modified material in routine. The multiplex PCR is used on the screening of GMO in food because its able to detect simultaneously several transgenic, being a less time and reagents consuming method, making the process of detection cheaper. In the present study, duplex PCR was tested for the detection of genetically modified soybeans tolerant to the herbicide glyphosate (Roundup Ready) and a multiplex PCR was tested for the simultaneous detection of three lineages of transgenic maize (MON810, Bt11 and Bt176) in samples of human food and feed. Two methodologies were used for extraction of DNA from samples: the CTAB method (already used by INCQS) and DNeasy[®] Mini kit. The results were compared to the standard method used by INCQS. Out of the forty samples, thirty samples were positive for the presence of Roundup Ready soybeans, fourteen were positive for at least one of the GM corn studied. Nine were positive for MON 810 maize, three were positive for Bt 11 maize, and five were positive for Bt 176 maize. The method proved to be robust and can be used on a routine for the detection of GMOs in food.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- μ L – microlitro
- μ M – concentração micromolar
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APHIS – *Animal and Plant Health Inspection Service*
- BRS – Serviços Reguladores de Biotecnologia
- Bt – *Bacillus thuringiensis*
- Bt11 - milho geneticamente modificado resistente a insetos
- Bt176 - milho geneticamente modificado resistente a insetos
- CaMV – vírus do mosaico da couve-flor
- CAT – enzima cloranfenicol acetil transferase
- CBD – Convenção sobre Diversidade Biológica
- CBF – *C-repeating binding factor*
- CBS – Comissão de Biossegurança em Saúde
- CDC – Código de Defesa do Consumidor
- CNBS – Conselho Nacional de Biossegurança
- COP – Conferência das Partes do Protocolo de Cartagena
- CP4- cepa de *Agrobacterium tumefaciens*
- CQB – Certificado de Qualidade em Biossegurança
- Cry ou ICPs– proteínas com corpo de inclusão cristalina de ação inseticida, também chamadas de δ -toxinas
- CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio
- CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
- CTP – peptídeo de transito cloroplástico de petúnia
- DNA ou ADN – Ácido Desoxirribonucléico
- DNAr – DNA recombinante
- dNTP – di-nucleosídeos trifosfatados
- DREB 1 – *Dehydration Responsive Element*
- E35S – promotor 35 S do vírus do mosaico da couve-flor
- EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético
- ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- EPA – *Environmental Protection Agency*
- EPIA – Estudo Prévio de Impacto Ambiental
- EPSPS – enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase

EUA – Estados Unidos da América
FDA – *Food and Drug Administration*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
for – iniciador senso
GM – Geneticamente modificado(a)
GTS – linhagem de soja tolerante a herbicida
GUS – enzima β -glucuronidase
h - hora
HD-1 – cepa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBOPE - Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística
IDEC – Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
M - concentração molar
mg - miligrama
 $MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio
min - minutos
mL - mililitro
mM – concentração mili-molar
MON810 - milho geneticamente modificado resistente a insetos
MOP – Reunião das Partes do Protocolo de Cartagena
mPCR – Multiplex PCR
mRNA – RNA mensageiro
NaCl – Cloreto de Sódio
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NPTII – enzima neomicina fosfotransferase II
OECD – Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento
OGM – Organismo Geneticamente Modificado
ORF – open reading frame
OSTP – *Office of Science and Technology Policy*
OVM – Organismo Vivo Modificado
PAT – enzima fosfotricina-N-acetiltransferase
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pH – Potencial de Hidrogênio

Plasmídeo Ti – plasmídeo indutor de tumor (*tumor inducing*)

PNB – Política Nacional de Biossegurança

POP – Procedimento Operacional Padronizado

rev – iniciador reverso.

RFLP – análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA

RIMA – Relatório de Impacto no Meio Ambiente

RNA – ácido ribonucléico

RNase A – enzima para clivagem do RNA

RPM – rotações por minuto

RR – soja Roundup Ready

SAAT – Transformação mediada por *Agrobacterium* e ultra-som

TBE – tampão Tris Borato EDTA

T-DNA – *transferred DNA*

U/ μ L – unidades por microlitro

UE – União Européia

USDA – *United States Department of Agriculture*

V - Volts

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Perfil eletroforético, em gel de agarose a 1%, dos produtos da reação de PCR utilizando os iniciadores específicos para milho Bt176, milho Bt11, milho MON810, zeína, lectina e soja RR.74
- FIGURA 2: Perfil eletroforético, em gel de agarose a 3%, dos produtos da reação do teste de robustez para mPCR de zeína do milho, milhos Bt11, Bt176, MON810 e soja RR e lectina de soja.....75
- FIGURA 3: Perfil eletroforético, em gel de agarose a 3%, dos produtos da reação dos testes preliminares da mPCR das amostras 007 (Raia 4), 065 (Raia 5), 3397/03 (Raia 6), 4863/03 (Raia 7), 010/05 (Raia 8) e 1283/05 (Raia 9) para a detecção da presença dos genes de lectina da soja, soja RR, milho Bt11, milho Bt176 e milho MON810 e zeína do milho.....76
- FIGURA 4: Perfil eletroforético, em gel de agarose a 3%, dos produtos da reação da duplex PCR para detecção de soja geneticamente modificada para tolerância ao herbicida glifosato (Roundup Ready®) (125 pb) e para o gene da lectina da soja (157 pb).....77
- FIGURA 5: Perfil eletroforético, em gel de agarose a 3%, dos produtos da reação da mPCR para detecção dos genes da zeína do milho, e dos milhos Bt11, Bt176 e MON810.....83

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Características dos sistemas nacionais de rotulagem nos principais países de acordo com o grau de estringência de suas regulamentações.....	44
QUADRO 2: Iniciadores utilizados na multiplex PCR e suas respectivas seqüências e especificidades.....	66
QUADRO 3: Pares de iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos amplificados para cada alvo.....	67
QUADRO 4: Concentração das soluções estoques e volume final dos iniciadores utilizados.	68
QUADRO 6: Resultados comparativos da primeira análise (realizada por PCR simples pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do INCQS), da segunda análise (com extração de DNA pelo método CTAB) e da terceira análise (extração de DNA pelo Kit DNeasy [®] Mini) obtidas pela duplex PCR de soja RR.	78
QUADRO 7: Resultados de segunda análise (com extração de DNA pelo método CTAB) e terceira análise (extração de DNA pelo Kit DNeasy [®] Mini) obtidos pela mPCR para detecção dos milhos Bt11, Bt176 e MON810.....	84
QUADRO 8: Resultados de primeira análise (realizada por PCR simples pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do INCQS) para pesquisa de milho geneticamente modificado.	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Tabela utilizada para cálculo de sensibilidade e especificidade através da comparação dos resultados obtidos por duas técnicas de diagnósticos distintas.	71
TABELA 2: Comparação entre os resultados da duplex PCR (segunda análise) com os resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia (INCQS-FIOCRUZ) (primeira análise) para o gene da lectina de soja.....	81
TABELA 3: Comparação entre os resultados da duplex PCR (segunda análise) com os resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia (INCQS-FIOCRUZ) (primeira análise) para o gene de resistência ao glifosato.....	81
TABELA 4: Comparação entre os resultados da duplex PCR (terceira análise) com os resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia (INCQS-FIOCRUZ) (primeira análise) para o gene da lectina de soja	82
TABELA 5: Comparação entre os resultados da duplex PCR (terceira análise) com os resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia (INCQS-FIOCRUZ) (primeira análise) para o gene de resistência ao glifosato.....	82

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico da Biotecnologia	2
1.2. Transgênicos ou OGMs	4
1.2.1. Transformações Genéticas de Plantas	5
1.2.1.1. Infecção por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
1.2.1.2. Eletroporação de Protoplastos	7
1.2.1.3. Biobalística (Gene GUN)	8
1.3. Aplicações dos Organismos Geneticamente Modificados	11
1.3.1. Aplicações de plantas geneticamente modificadas	11
1.3.1.1. Resistência à pragas	12
1.3.1.1.1. A tecnologia Bt	13
1.3.1.2. Tolerância a herbicidas	20
1.3.1.3. Tolerância a estresse	22
1.3.1.4. Aumento da utilização de nitrogênio	23
1.3.1.5. Melhoramento da qualidade nutricional	24
1.3.1.6. Plantas como produtora de Fármacos e como Biofábricas	25
1.4. Situação Global das Lavouras Geneticamente Modificadas	25
1.5. Avaliação de Risco de Transgênicos	28
1.5.1. Efeitos não Intencionais de Alimentos GM sobre a Saúde Humana	35
1.5.1.1. Modificações do metabolismo e efeitos pleiotrópicos de proteínas transgênicas	36
1.5.2. Transferência horizontal	37
1.6. Políticas Internacionais de Rotulagem de Produtos que Contém Organismos Geneticamente Modificados	39
1.6.1. A Convenção sobre Diversidade Biológica e o Protocolo de Cartagena	40
1.6.2. Abordagens Internacionais para a Rotulagem de Produtos GM	42
1.6.3. Rotulagem de Produtos GM na União Européia	43
1.6.4. Rotulagem de Produtos GM nos Estados Unidos da América	46
1.7. Legislação para OGM no Brasil	47
1.7.1. A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio	48
1.7.2. Aprovações comerciais no Brasil	50
1.7.3. Rotulagem de Produtos que contém OGM no Brasil	51

1.8. Detecção de OGMs em alimentos	54
1.8.1. A multiplex PCR - mPCR	56
2. OBJETIVO GERAL	61
2.1. Objetivos Específicos	61
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.1. Amostras de Alimentos.....	62
3.2. Materiais de Referência.....	62
3.3. Extração de DNA.....	63
3.3.1. Pesagem do Material	63
3.3.2. Método CTAB	63
3.3.3. DNeasy® Mini Kit da Qiagen	64
3.4. Multiplex PCR.....	65
3.4.1. Iniciadores.....	66
3.4.2. Condições para a PCR:	67
3.4.2.1. Controles Positivos:.....	67
3.4.2.2. Controles Negativos:	67
3.4.3. Preparo das Soluções de Amplificação.....	67
3.4.3.1. Reação de Amplificação.....	68
3.5. Eletroforese em Gel de Agarose:.....	69
3.6. Teste de Especificidades dos Iniciadores.....	69
3.7. Padronização da PCR Multiplex (mPCR).....	69
3.8. Teste de Robustez.....	69
3.9. Análise das amostras	70
3.10. Teste de Homogeneidade entre os Resultados Obtidos pela mPCR com os Diferentes Tipos de Extração de DNA.....	70
3.11. Cálculo de especificidade e sensibilidade das análises.....	70
4. RESULTADOS.....	73
4.1. Teste de especificidade dos iniciadores	74
4.2. Teste de Robustez.....	75

4.3. Análise das Amostras	76
4.4. Resultado da Pesquisa de Soja Geneticamente Modificada nas Amostras de Alimentos.....	77
4.4.1. Teste de Homogeneidade entre os Resultados Obtidos pela mPCR com os Diferentes Tipos de Extração de DNA.....	80
4.4.1.1. Lectina.....	80
4.4.1.2. Soja RR.....	80
4.4.2. Especificidade e Sensibilidade.....	81
4.5. Resultado da Pesquisa de Milho Geneticamente Modificado nas Amostras de Alimentos.....	83
4.5.1. Teste de Homogeneidade entre os Resultados obtidos pela mPCR com os Diferentes Tipos de Extração de DNA.....	85
4.5.1.1. Zeína	86
4.5.1.2. Bt11	86
4.5.1.3. Bt176	86
4.5.1.4. MON810	87
5. DISCUSSÃO	88
5.1. Pesquisa da soja geneticamente modificada.....	89
5.2. Pesquisa do milho geneticamente modificado.....	91
5.3. Considerações finais	95
6. CONCLUSÃO.....	97
7. REFERÊNCIAS.....	98

1. INTRODUÇÃO

A ciência e a tecnologia são duas atividades muito ligadas a nosso cotidiano. A ciência está associada ao desejo humano de saber, compreender, explicar ou prever fenômenos naturais. A tecnologia decorre de outro desejo: o de encontrar novas e melhores maneiras de satisfazer as necessidades humanas, usando para isso conhecimentos, ferramentas, recursos naturais e energia (FARIA & SANTOS, 2007).

À primeira vista, ciência, tecnologia e inovação parecem ter pouco a ver com qualidade de vida. Entretanto, em uma sociedade moderna, elas são indissociáveis. Para prover saúde, alimentação, trabalho, lazer, segurança e um meio ambiente adequado, a sociedade precisa dispor de conhecimento e de saber aplicá-lo na solução de seus problemas. Em longo prazo, a sobrevivência da humanidade depende da gestão adequada do meio ambiente global e, para isto, é preciso poder prever as conseqüências das intervenções cada vez mais importantes dos seres humanos sobre o seu habitat (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2007).

Tecnicamente, o termo biotecnologia representa um conjunto de tecnologias que utilizam sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para a produção ou modificação de produtos e processos para uso específico, bem como para gerar novos serviços de alto impacto em diversos segmentos industriais. (BRASIL, 2007).

O termo biotecnologia foi utilizado pela primeira vez em 1917 pelo engenheiro húngaro Karl Ereky para descrever a produção em larga escala de porcos que eram alimentados com beterrabas. Neste último século, o termo tem sido aplicado à utilização de qualquer organismo vivo com finalidades práticas – desde melhoramentos genéticos tradicionais de plantas e animais à fermentação de cervejas ou tratamentos de esgotos com materiais orgânicos (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

A biotecnologia é uma das ferramentas tecnológicas mais importantes da atualidade. Suas aplicações têm contribuído para a estruturação de novos sistemas econômicos e sociais, especialmente a partir da manipulação das menores estruturas que compõem os seres vivos (BRASIL, 2007).

A utilização destas biotecnologias inovadoras tem contribuído para o aumento da qualidade de vida e gerado novos caminhos para o desenvolvimento econômico.

Assistimos a uma verdadeira revolução no tratamento de doenças, no uso de novos medicamentos para aplicação humana e animal, na multiplicação e reprodução de espécies vegetais e animais, no desenvolvimento e melhoria de alimentos, na utilização sustentável da biodiversidade, na recuperação e tratamento de resíduos, dentre outras áreas, com potencial cada vez maior de inovações e de geração de novos produtos (BRASIL, 2007).

1.1. Histórico da Biotecnologia

A alteração de genes de plantas e animais para melhor satisfazer as necessidades humanas não é um acontecimento recente. Desde a mais remota antiguidade, os genes têm sido permutados entre indivíduos da mesma espécie, no processo de reprodução sexual e, mesmo entre representantes de diferentes espécies com algumas restrições (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001; AMBIENTEBRASIL, 2004).

Os agricultores sabem há séculos que podem melhorar gradualmente as suas culturas pelo replantio de sementes das melhores plantas. Da mesma forma, sabiam que poderiam melhorar seus animais através do acasalamento dos melhores pares. Alguns também perceberam que poderiam criar novas variedades de vegetais e de animais com as características desejadas, através da seleção cuidadosa de sutis diferenças (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

Ao longo dos séculos o processo de seleção artificial (com interferência humana) criou uma diversidade de alimentos com uma grande variedade de características. O feijão que é consumido e o milho que é utilizado na alimentação humana e animal são completamente diferentes daqueles que nossos antepassados utilizavam. Os feijões silvestres domesticados pelo homem nos últimos 12.000 anos, e que hoje ainda existem no México e em alguns países andinos, é diferente dos feijões carioca e preto hoje disponíveis. Com sementes menores que as sementes de mamão, de difícil cocção, baixa digestibilidade e com sabor adstringente, o feijão silvestre foi geneticamente modificado pelos agricultores primitivos, ao longo de sua domesticação, de forma que atualmente dispomos de variedades com grãos grandes, de fácil cocção e com boa digestibilidade. O ancestral do milho, o teosinto, foi também geneticamente modificado pelo homem ao longo dos milênios, dando origem ao milho moderno hoje utilizado. Foi a engenhosidade humana trabalhando os princípios da genética, de forma inconsciente, que resultou nas espécies

agronômicas que o homem hoje utiliza (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001; BENEDITO & FIGUEIRA, 2004).

A primeira grande descoberta que influenciou a maneira de se modificar as plantas em benefício da sociedade aconteceu em 1865, por Gregor Mendel, considerado o pai da Genética. Mendel foi ignorado pelos seus contemporâneos e seus trabalhos permaneceram no ostracismo por 35 anos, até que em 1900 as Leis da Genética foram redescobertas e a modificação genética das plantas pode ser realizada de forma científica. A redescoberta, no início do século, das leis de Mendel por Hugo de Vries, Karl Correns e Erich Tschermak von Seysenegg proporcionou ao melhoramento uma sistematização. A hibridização entre espécies diferentes pode ocorrer, naturalmente, sendo maior a probabilidade de acontecer entre espécies "próximas", sobretudo entre as que pertencem ao mesmo gênero (o que indica uma separação mais recente de "caminhos evolutivos"). Mas, para ter êxito, grande parte dos cruzamentos entre espécies requer a intervenção humana originando então o melhoramento genético das plantas, como ciência (BENEDITO & FIGUEIRA, 2004).

O conhecimento científico continuou evoluindo e a genética inicial de Mendel passou a contar com recursos ainda mais modernos, a exemplo da genética molecular, considerada como uma nova ciência dentro da biotecnologia (BENEDITO & FIGUEIRA, 2004).

Nos últimos 50 anos, desde a descoberta da estrutura do ácido desoxirribonucléico (ADN, ou DNA em inglês), por Francis Harry Compton Crick, James Dewey Watson e Maurice Hugh Frederick Wilkins, os cientistas têm feito enormes progressos para a compreensão do funcionamento dos genes. Os genes são segmentos de DNA com longas seqüências, dispostos em cromossomos, presentes na maioria das células, quer vegetal, animal ou humana. Através de uma série de "mensageiros" moleculares, os genes produzem, ou expressam milhares de proteínas responsáveis por praticamente toda a atividade dos processos dos seres vivos. Em geral, cada gene dirige a produção de uma proteína específica que tem uma função específica. A expressão do gene é regulada por diferentes segmentos de DNA que causam a ativação ou inativação, a iniciação ou o término de produção de proteínas (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

A partir da década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição houve o desenvolvimento da engenharia genética e a conseqüente descoberta da tecnologia do DNA recombinante que permitiu modificar diretamente o genoma de um determinado organismo, seja pela produção intencional de genes exógenos que

possuem função conhecida, seja pela eliminação de genes do genoma do organismo manipulado, ou até mesmo pelo remanejamento dos próprios genes do organismo alvo (GUERRANTE, 2003).

Com as técnicas de engenharia genética, qualquer gene de qualquer organismo pode ser isolado e transferido para o genoma de qualquer outro ser vivo, por mais divergente ou distante que esteja na escala evolucionária. Esta possibilidade amplia consideravelmente os recursos genéticos para o melhoramento de plantas e animais, resultando na obtenção de organismos geneticamente modificados (OGMs), também denominados, por alguns especialistas, de organismos transgênicos (GUERRANTE, 2003).

A expectativa é de que esta tecnologia melhore tanto a tecnologia de reprodução quanto o desenvolvimento de novas variedades de plantas de alta qualidade e rendimento, como as tolerantes a pestes, a doenças e ao estresse ambiental, entre outros. Muitos cultivos de plantas geneticamente modificadas têm sido aprovados no mundo inteiro, desde 1994, dentre os quais podemos destacar o milho, a soja, a canola e o algodão, além do tomate e do mamão em menor escala (GERMINI et al., 2004; CARDARELLI et al., 2005).

1.2. Transgênicos ou OGMs

Transgênicos são organismos vivos, sejam eles plantas, animais ou microorganismos, cujo material genético foi alterado por meio de engenharia genética pela introdução de seqüências de DNA exógenas que podem ser originárias de qualquer organismo vivo, inclusive de organismos filogeneticamente distantes à espécie a ser modificada, ou pela inativação de genes endógenos. O conhecimento da estrutura básica de um OGM é importante para compreender o princípio de alguns métodos utilizados na detecção destes organismos. Um típico inserto de um OGM é composto por três elementos: região promotora, que funciona como um ativador/ inibidor para a leitura do gene inserido/ alterado; o gene de interesse, que foi inserido/ alterado o qual codifica a característica específica desejada; e o elemento terminador, responsável pelo término da expressão. Além destas, outras seqüências exógenas de DNA, responsáveis principalmente pela regulação e estabilização do gene inserido, podem estar eventualmente presentes com a função de controlar e estabilizar a função do gene, demonstrar a presença da expressão no OGM ou facilitar a combinação de vários elementos de construção. A

combinação de todos estes elementos caracteriza um evento, ou seja, a construção gênica característica de um OGM (CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006; MIRAGLIA et al., 2004).

1.2.1. Transformações Genéticas de Plantas

A transformação genética pode ser definida como a introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma hospedeiro ou genoma receptor, devendo ser a ele integrado. É uma técnica de transferência não sexuada de genes para plantas. (PEREIRA, 2004).

Para o desenvolvimento de plantas transgênicas é essencial que se tenha disponibilidade de um sistema de cultura de tecidos que permita a regeneração de plantas e de um sistema de transformação genética que possibilite a introdução de genes com eficiência. A transferência de genes na transformação genética pode ser direta ou indireta. A transferência indireta é aquela que utiliza um vetor para intermediar a transformação, como *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*. A transferência direta é baseada em métodos físicos ou químicos, onde se destacam a eletroporação e a aceleração de partículas (biobalística) (PEREIRA, 2004).

1.2.1.1. Infecção por *Agrobacterium tumefaciens*

As agrobactérias (*Agrobacterium* spp.) são microrganismos Gram-negativos tipicamente encontradas no solo. Não formam esporos e possuem forma de bacilo, medindo 0,6-1,0 x 1,5-3,0 μm , e com um a seis flagelos peritríquios. Em geral, as agrobactérias são aeróbias, apresentando o oxigênio como aceptor final de elétrons. Alguns isolados podem ter respiração anaeróbia, em presença de nitrato, outros podem sobreviver em ambientes com baixa tensão de oxigênio, como no interior dos tecidos de plantas hospedeiras. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25 a 28°C, e as culturas geralmente apresentam colônias convexas, circulares, lisas, apigmentadas ou de coloração levemente creme (ANDRADE, SARTORETTO & BRASILEIRO, 2003).

Em condições naturais, as agrobactérias somente se estabelecem em locais injuriados da planta originando as doenças conhecidas como galhas de coroa e raízes em cabeleira que são importantes em regiões de clima temperado,

especialmente em viveiros de fruteiras (parreiras, amendoeiras, ameixeiras, macieiras e pessegueiros) que são propagadas vegetativamente ou por enxertia. Os ferimentos, resultantes da manipulação das plantas, favorecem a instalação da agrobactéria (BARROS et al., 2004).

O gênero *Agrobacterium* está subdividido em cinco espécies que diferem entre si pela patogenicidade e pelo modo de infecção em diferentes plantas. Dessa forma, *A. tumefaciens* é o agente etiológico da galha da coroa; *A. rhizogenes* causa a raiz em cabeleira; *A. vitis*, induz tumores especificamente em uvas (*Vitis* spp); *A. rubi* induz tumores especificamente em amora (*Rubus* spp) e *A. radiobacter* é saprófita, não patogênica. (MONQUERO et al., 2005).

Mais de 600 espécies vegetais são conhecidamente suscetíveis à infecção por *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, pertencendo a maioria delas à classe de Angiospermas dicotiledôneas e Gimnospermas e, mais raramente, às Angiospermas monocotiledôneas (MONQUERO, 2005).

A bactéria *A. tumefaciens* é capaz de infectar células vegetais, causando uma doença conhecida como galha da coroa caracterizada pelo desenvolvimento de um tumor no local da infecção. A doença está associada à presença, na *Agrobacterium*, de um plasmídio de alto peso molecular, o plasmídio Ti (*tumor inducing*). Durante o processo de infecção, uma seqüência específica presente no plasmídio Ti, o T-DNA (*transferred DNA*), é transferida da *Agrobacterium* para a célula vegetal. A expressão de genes presente no T-DNA, os oncogenes, interfere na biossíntese de hormônios vegetais (citocininas e auxinas), levando à formação das galhas. Embora os oncogenes sejam responsáveis pela formação do tumor, as únicas regiões do T-DNA essenciais para sua transferência são as seqüências de cerca de 25 pares de base localizadas nas extremidades. Assim, os genes presentes no T-DNA podem ser deletados (obtenção de linhagens “desarmadas”) e substituídos por genes de interesse, sem alterar o processo de transferência (MONQUERO, 2005).

A descoberta de que a indução das galhas por *A. tumefaciens* era resultante de um processo natural de transferência de genes do plasmídio Ti para o genoma da planta infectada, deu um novo incentivo às pesquisas nesta área. Desta forma, duas regiões no plasmídio Ti envolvidas diretamente no processo de indução tumoral foram identificadas: a região-T, que corresponde ao segmento de DNA transferido para a célula vegetal, e a região de virulência (região *vir*), que contém genes envolvidos na síntese de proteínas responsáveis pelo processo de transferência da região-T (ANDRADE, SARTORETTO & BRASILEIRO, 2003).

Os vetores utilizados para sistemas de transformação são vetores chamados desarmados, isto é, não possuem os oncogenes em seu plasmídeo, mas retêm os genes de virulência (região *vir*), localizados no plasmídeo Ti, e os genes do cromossomo bacteriano (*chv*, *pscA* e *att*). Estas construções de plasmídeos possuem promotores de plantas e genes bacterianos que conferem resistência a drogas ou antibióticos, fazendo com que estes marcadores sejam eficientes para a seleção de células ou plantas transformadas (BARBOSA, 2002).

A primeira demonstração de que esta interação bactéria-planta poderia resultar em sistemas eficientes de transformação de plantas foi a introdução do gene que confere resistência ao antibiótico canamicina em plantas de fumo, em 1983, confirmando a possibilidade de manipulação do plasmídeo de *Agrobacterium*, permitindo assim, a passagem de uma informação genética desejada para o interior de uma célula hospedeira (BARBOSA, 2002).

A técnica de transformação por *Agrobacterium* tem sido aprimorada desde 1988, quando foi relatado o uso de *A. tumefaciens* modificada geneticamente para introdução de genes exógenos em plantas. Na transformação utilizando esse vetor, vários parâmetros são considerados, entre eles, a presença de substâncias fenólicas para indução da transferência do T-DNA, o pH, a temperatura, os açúcares que compõem o meio de cultura, o período de co-cultivo e os antibióticos para controle do crescimento da bactéria (SANTARÉM 2000a).

Outro aprimoramento proposto foi o uso de pulsos de ultra-som para ferir e modificar o tecido alvo, visando o aumento da infecção por *Agrobacterium*. Essa técnica foi denominada de Transformação mediada por *Agrobacterium* e Ultra-som – SAAT, e tem gerado expectativas quanto a maior eficiência na transferência de genes usando *Agrobacterium*. (SANTARÉM, 2000b).

1.2.1.2. Eletroporação de Protoplastos

A transformação genética através da eletroporação de protoplastos foi criada para espécies vegetais importantes comercialmente, como a canola (*Brassica napus*), o milho e o arroz, mas exige um protocolo efetivo de regeneração de protoplastos à plantas transgênicas férteis, o desenvolvimento de protocolos de regeneração genótipo-específicos, longos períodos de cultivo *in vitro* que podem induzir alterações genéticas e epigenéticas, e intenso trabalho e experiência (QUENCINI, 2001).

É uma técnica simples e eficaz para uma ampla variedade de tipos celulares e tem sido utilizada para induzir a captação de nucleotídeos, ácidos nucléicos, corantes indicadores e proteínas. A eletroporação de protoplastos tem sido utilizada também para transformações estáveis de várias espécies de plantas sendo também utilizada para estudos de expressão gênica por meio de ensaios transientes (BATES, 1994).

Em células vegetais, a captação do DNA exógeno é impedida pela parede celular e a eletroporação é frequentemente utilizada para a introdução de DNA plasmidial nessas células. Esta técnica é mais eficiente quando utilizadas em protoplastos, que são células desprovidas de paredes celulares, embora existam alguns relatos indicando que a eletroporação pode ser utilizada com sucesso em tecidos vegetais intactos (BATES, 1994).

Para a introdução de DNA usando a eletroporação, os protoplastos são expostos a pulsos curtos de corrente contínua e alta voltagem, em presença do DNA exógeno. Esse tratamento induz uma alteração reversível da permeabilidade da membrana plasmática e poros temporários são formados, permitindo a entrada do DNA nas células. A extensão da formação de poros é determinada pela intensidade e duração do pulso elétrico e pela concentração iônica do tampão de eletroporação. Os poros aumentam em tamanho e número com o aumento da duração e intensidade dos pulsos. Para que a eletroporação seja eficaz, parâmetros como tipo e duração dos pulsos elétricos, intensidade do campo elétrico, concentração e forma do DNA, presença ou ausência de DNA carreador, composição do tampão de eletroporação e temperatura de incubação dos protoplastos devem ser determinados (SANTARÉM, 2000a).

1.2.1.3. Biobalística (Gene GUN)

A técnica da biobalística (balística biológica), também conhecida por biolística, aceleração de partículas, aceleração de microprojéteis (SANTARÉM, 2000a) ou bombardeamento de partículas foi descrita inicialmente por Sanford et al. (1987) com o objetivo de introduzir material genético no genoma nuclear de plantas superiores. Este bombardeamento é feito em equipamento apropriado capaz de acelerar as partículas (de 0,2-4 μm de diâmetro) cobertas com seqüências de DNA a velocidades maiores de 1.500 km/h. Foi demonstrado que os microprojéteis penetram à parede e à membrana celular de maneira não letal, alojando-se

aleatoriamente nas organelas celulares. Desde então, sua universalidade de aplicações tem sido avaliada, demonstrando ser um processo também efetivo e simples para a introdução e expressão de genes em bactérias, fungos, protozoários, algas, insetos e tecidos animais (MONQUERO, 2005; FERREIRA et al., 2004).

O método baseia-se no uso de um equipamento que produz uma força propulsora, usando propulsão a ar, pólvora, gás hélio ou eletricidade, para acelerar micropartículas inertes em direção às células alvo (SANTARÉM, 2000a; FERREIRA et al., 2004).

Os sistemas que utilizam gás hélio são, atualmente, os mais utilizados. A onda de choque é gerada pela rápida liberação de uma descarga de alta pressão de gás hélio (1000-1200 psi). A onda de choque gerada impulsiona o macrocarregador, no qual os microprojéteis foram previamente depositados. Ao atingir a tela de retenção, a membrana é retida e as micropartículas contendo o DNA continuam em direção às células-alvo, penetrando na parede celular e membrana plasmática. Após o bombardeamento, uma proporção de células atingidas permanece viável; o DNA é integrado no genoma vegetal e incorporado aos processos celulares de transcrição e tradução, resultando na expressão estável do gene introduzido (SANTARÉM, 2000a; GUTIERREZ, 2003; FERREIRA et al., 2004).

Diversos parâmetros físicos e biológicos devem ser levados em consideração para se estabelecer um protocolo de transformação utilizando-se esse método, tais como a espécie vegetal e seu estado fisiológico, o tipo de explante, tipo e tamanho da partícula, método de precipitação, velocidade das partículas e tipo de equipamento (SANFORD, SMITH & RUSSEL, 1993).

Os microprojéteis são fabricados usando metais de alta densidade, como tungstênio e ouro; são mais ou menos esféricos e medem cerca de 0,4 μm de diâmetro. As partículas de tungstênio são mais baratas, porém, mais heterogêneas em tamanho e forma, quando comparadas com as de ouro. As partículas de ouro, em razão da sua mais alta densidade, penetram no tecido até as camadas celulares mais profundas, ao passo que a maioria das partículas de tungstênio não penetra além das camadas superficiais. Sendo assim, a relação entre o tipo de microprojéteis usado para o bombardeamento e a expressão temporária ou estável do gene introduzido deve ser avaliada para cada espécie e tecido estudados (SANFORD, 1990; SANTARÉM, 2000a).

O uso do processo biolístico é bastante amplo e, quando comparado com a maioria dos métodos diretos de introdução de DNA em plantas, o bombardeamento

de microprojéteis apresenta várias vantagens. É uma técnica altamente versátil e de fácil adaptação, podendo ser aplicada a grande variedade de células e tecidos, incluindo suspensões, calos, tecidos meristemáticos, embriões imaturos, e embriões somáticos. Essa técnica tem permitido a regeneração de plantas transgênicas de maneira reproduzível e com menos variabilidade entre os experimentos. As metodologias empregadas são simples, eficientes e essencialmente idênticas, independentemente do tecido vegetal e do DNA exógeno empregado (SANTARÉM, 2000a).

Além do seu uso para obtenção de organismos geneticamente transformados, o processo de bombardeamento de microprojéteis tem contribuído para os estudos dos mecanismos de expressão e regulação gênica (SANTARÉM, 2000a).

Algumas adaptações da biobalística têm sido propostas associando o bombardeamento ao método de infecção por *Agrobacterium*. Os microferimentos produzidos pela penetração das partículas nos tecidos bombardeados ampliam a área de infecção pela bactéria, aumentando a eficiência da transformação. Essa técnica, denominada “agrolística”, permite a transferência do gene de interesse para o genoma da planta, sem que haja a integração das seqüências dos vetores. Isso ocorre em virtude da co-transformação de dois dos genes de virulência, juntamente com um marcador de seleção flanqueado pelas seqüências de bordas do T-DNA (SANTARÉM, 2000a).

Após a transformação através de qualquer um dos métodos, o passo seguinte é a obtenção de plantas e sementes das células que incorporaram o gene de interesse através de cultura de tecido. Durante essa fase, várias análises são realizadas para selecionar plântulas que incorporaram o gene escolhido. O uso de um bom marcador de seleção é fundamental para a recuperação “in vitro” eficiente de plantas transgênicas. O marcador de seleção confere caráter dominante às células transformadas, resultantes da incorporação de nova característica, que não está presente nas células não transformadas. Essa nova característica permite a sobrevivência da célula vegetal na presença de um agente de seleção que é, geralmente, um antibiótico ou um herbicida (MONQUERO, 2005)

Os genes marcadores mais utilizados são: o gene *gus*, que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS); o gene *lucA* da luciferase; o gene *nptII*, ou *neo* da neomicina fosfotransferase II (NPT II) e o gene *cat*, da cloranfenicol acetiltransferase (CAT). Ao contrário dos ensaios para a detecção da atividade na NPTII e CAT, que utilizam radioisótopos, e do utilizado para luciferase, que utiliza um luminômetro, o ensaio da

GUS não requer radioatividade nem equipamentos específicos, embora seja destrutivo (MONQUERO, 2005)

Após algum tempo de desenvolvimento, as plantas são transferidas para vasos e se desenvolvem em casa de vegetação com condições controladas, para a obtenção de sementes. Inicia-se então a fase de teste em campo, que tem por objetivo verificar o comportamento dessas plantas em condições normais de cultivo, sua eficiência agrônômica e sua capacidade de transferir o gene para outras plantas da mesma espécie (MONQUERO, 2005).

1.3. Aplicações dos Organismos Geneticamente Modificados

O desenvolvimento de organismos geneticamente modificados tem sido definitivamente impulsionado pelo potencial que representam como modelo e ferramenta para o estudo da ciência básica e para a melhoria de produtos e de processos (GUERRANTE, 2003).

Na pesquisa básica, os organismos geneticamente modificados fornecem excelentes modelos para o estudo de processos celulares básicos, como a regulação da expressão gênica e a genética molecular do desenvolvimento e da diferenciação celular. Permitem também os estudos de defeitos (alterações ou mutações) genéticos que podem por exemplo, originar câncer (GUERRANTE, 2003).

Na biotecnologia aplicada, os OGMs como bactérias, fungos, plantas e animais podem funcionar como biorreatores para a produção de proteínas valiosas ou para propósitos industriais (GUERRANTE, 2003).

1.3.1. Aplicações de plantas geneticamente modificadas

A agricultura tem constantemente passado por transformações a fim de atender a demanda alimentar que cresce de forma espantosa. Dentre as inúmeras transformações (descobertas ou desenvolvimentos), ressaltam-se as associadas à área de melhoramento de plantas, à qual está relacionada ao aumento, tanto qualitativo como quantitativo, do que é produzido anualmente. Tais transformações, ocorridas basicamente no século XX, tiveram profundo impacto na maneira de se fazer o melhoramento de plantas (BORÉM & MILACH, 1999).

O conhecimento e o domínio de técnicas de engenharia genética, que compreendem as operações de isolamento, modificação e transferência de

fragmentos de DNA, proporcionaram a obtenção plantas com determinadas características, que não podem ser obtidas normalmente através de métodos convencionais (cruzamento), incluindo-se aí características de espécies diferentes e até de microorganismos (FRIZZAS et al, 2004).

Desta forma, foram desenvolvidos produtos para oferecerem melhores soluções aos problemas agrícolas tradicionais: facilitar a produção de alimentos; gerar alimentos com melhor qualidade nutricional; utilizar produtos agrícolas para fins não alimentícios (fibras, combustíveis e outros produtos) (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

Pesquisadores de indústrias e universidades têm explorado diferentes estratégias para aumentar os rendimentos das culturas ou tornar mais fácil a produção alimentar. Uma delas é atacar as causas das perdas das culturas, como as pragas (insetos, vírus e doenças), o estresse (variabilidade meteorológica como seca e geada) e concorrentes de nutrientes do solo (ervas daninhas). Outra estratégia foca-se na melhoria da capacidade da planta de crescer em solos que são deficientes em nutrientes ou que tenham excessos de minerais ou salinidade. Os pesquisadores acreditam que a biotecnologia pode reduzir os custos para os agricultores e, em alguns casos, reduzir o uso de pesticidas químicos, em comparação com a agricultura convencional. Entre as características agronômicas utilizadas para a modificação de plantas são estão a resistência à pragas (vírus, fungos, insetos, bactérias, nematódeos, etc); a tolerância à herbicidas; a tolerância a estresse (hídrico, pH, salinidade, mudança de temperatura); o melhoramento da utilização de nitrogênio – aumento da incorporação de amônio em proteínas (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

1.3.1.1. Resistência à pragas

Os agricultores vêm tentando minimizar perdas de colheitas causadas por pragas durante centenas de anos. No passado, utilizavam práticas de cruzamentos convencionais, como a hibridização, para desenvolver culturas com melhor resistência a pragas, ou a inseticidas químicos ou a sistemas biológicos de controle, tais como insetos predadores que atacam diretamente as pragas das culturas. Com o advento das técnicas de engenharia genética, os pesquisadores podem obter plantas mais resistentes a pragas inserindo genes de resistência específica oriundos de outras plantas ou organismos, sendo que, as técnicas de DNA recombinante

foram os primeiros métodos utilizados para se fazer isso. Esta primeira geração de técnicas de engenharia genética para resistência a doenças baseia-se, essencialmente, na alteração de uma característica condicionada por um único gene. No entanto, existem características de resistência, como as de resistência fúngica, que envolvem a interação de vários genes. Assim, estratégias de engenharia genética têm se concentrado nos meios para controlar a transferência de múltiplos genes relacionados ao desenvolvimento de resistência a pragas ou a vários agentes patogênicos com a utilização de muitas transformações genéticas (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

Vários esforços têm sido realizados para construir culturas resistentes a doenças e uma das abordagens é encontrar variedades de plantas que demonstrem resistência a um determinado organismo infeccioso e, em seguida, determinar os componentes genéticos responsáveis por essa resistência natural. Assim, os genes responsáveis podem ser transferidos para plantas que não os tenham. Uma outra estratégia é a identificação dos genes responsáveis pela geração de substâncias que atuam contra agentes patogênicos e, propiciar a planta a aumentar essa capacidade. Outras manipulações podem ter como objetivo a eliminação dos insetos que transmitem danos a culturas e transmitem vírus e fungos patogênicos (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

1.3.1.1.1. A tecnologia Bt

Os insetos têm sido uma das maiores causas de danos na produção de alimentos, sendo estas perdas da ordem de 20 a 30% da produção mundial. Estima-se que cerca de 67.000 espécies de insetos causem danos às plantações e as regiões tropicais, normalmente as mais pobres do mundo, são as que mais sofrem com a alta incidência de insetos-praga (BOBROWSKI, 2003).

A microflora bacteriana dos insetos, confinada no intestino, é rica, diversa e compreende bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Entre as bactérias Gram-positivas algumas auxiliam na digestão dos alimentos, porém outras são patogênicas e recebem grande atenção dos pesquisadores devido ao seu magnífico potencial para o controle de pragas agrícolas e urbanas. Entre estes patógenos destaca-se o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), bactéria em forma de bastonete, formadora de esporos e capaz de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, que são responsáveis pela atividade tóxica desta espécie (POLANCZYK & ALVES, 2003).

O *B. thuringiensis* desenvolve-se, em condições aeróbias, em meios artificiais bastante simples. Sob certas restrições, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, esta bactéria entra em processo de esporulação durante a fase estacionária. No início da esporulação o *B. thuringiensis* sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade inseticida. As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina, por isso são denominadas Cry. Estas toxinas são codificadas por genes *cry*, que podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (40-200MDa) ou em ambos, e sua toxicidade está ligada à região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto a porção C-terminal determina a forma da estrutura do cristal (POLANCZYK & ALVES, 2003). Estes cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry, também chamadas de δ -endotoxinas ou Insecticidal Crystal Proteins (ICPs). Tais proteínas são altamente tóxicas e específicas, por isso inócuas para a maioria dos outros organismos, incluindo insetos benéficos (BOBROWSKI, 2003).

Após a ingestão do *B. thuringiensis* pelo inseto, os cristais são solubilizados em pH alcalino, liberando as protoxinas que em presença de enzimas digestivas (proteínases) são proteoliticamente convertidas em polipeptídeos menores contendo 4 ou mais polipeptídeos tóxicos (δ -endotoxinas) no trato digestivo das larvas suscetíveis. Essas toxinas hidrolizadas atravessam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que pouco tempo após a infecção o inseto cessa a sua alimentação (BOBROWSKI, 2003; POLANCZYK & ALVES, 2003).

Diferentes cepas de *B. thuringiensis* podem produzir um ou mais cristais e estes, por sua vez, conter uma ou mais toxinas com peso molecular variado. Por exemplo, *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 contém três Cry1 (130 kDa) e duas Cry2 (70 kDa), enquanto que *B. thuringiensis tenebrionis* produz uma única toxina com peso molecular de 67 kDa. A forma do cristal é determinada pelo número de δ -endotoxinas presentes (POLANCZYK & ALVES, 2003).

Genes de *B. thuringiensis* codificadores de proteínas Cry foram isolados e introduzidos em plantas agronomicamente importantes utilizando diferentes métodos

de transformação genética como aqueles que empregam *Agrobacterium*, transformação direta de protoplastos e biobalística. (BOBROWSKI, 2003).

A grande maioria das plantas transgênicas resistentes a insetos expressa genes derivados da bactéria *B. thuringiensis*, e diversas culturas, tais como milho, algodão, soja, arroz e canola, dentre outras, têm sido modificadas geneticamente para expressar proteínas derivadas de *B. thuringiensis* – tecnologia Bt (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

Bobrowski (2003) especulou que a outras gerações de plantas-Bt apresentariam múltiplos genes *cry*, oferecendo aos produtores um maior espectro de proteção contra diferentes insetos-praga reduzindo a probabilidade dos mesmos desenvolverem resistência (BOBROWSKI, 2003).

O milho Resistente a Insetos

a) Milho Bt11

O milho da linhagem Bt11 (SYN-BTØ11-1 (BT11 (X4334CBR, X4734CBR))) foi desenvolvido pela Sygenta Seeds, Inc. através de uma modificação genética específica para ser resistente ao ataque da broca do milho Europeu (BCE; *Ostrinia nubilalis*), uma das principais pragas de milho na agricultura. A nova variedade produz uma proteína inseticida, a Cry1Ab, derivada de *Bacillus thuringiensis*, subesp. *Kurstaki* (Btk) estirpe HD-1. As δ -endotoxinas, como a proteína Cry1Ab expressa em Bt11, agem seletivamente em sítios de ligação específicos localizados na borda em escova do epitélio do intestino médio de espécies de insetos sensíveis. Após a ligação, são formados poros que interrompem o fluxo de íons no intestino médio causando paralisia e morte. A δ -toxina Cry1Ab tem ação inseticida apenas em insetos lepidópteros, devido à sua ação específica nos insetos alvo. Não existem sítios de ligação para δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, na superfície das células intestinais de mamíferos, não sendo animais e humanos, portanto, sensíveis a estas proteínas (AGBIOS, 2005b).

O milho Bt11 também foi geneticamente modificado para expressar o gene *pat* clonado a partir de um actinomiceto aeróbio comum no solo, o *Streptomyces viridochromogenes* estirpe Tu494, que codifica a enzima fosfinotricina-N - acetiltransferase (PAT). A enzima PAT foi utilizada como um marcador de seleção permitindo a identificação das células vegetais transformadas, bem como uma fonte

de resistência ao herbicida fosfinotricina (também conhecido como glufosinato de amônio, o ingrediente ativo nos herbicidas Basta, Rely, Finale, e Liberty). O glufosinato de amônio atua através da inibição da produção da enzima glutamina sintase, a única enzima nas plantas que desfaz a ação tóxica da amônia pela incorporação desta à glutamina. A inibição desta enzima leva ao acúmulo de amônia nos tecidos da planta, que morre dentro de poucas horas após aplicação do herbicida. A PAT catalisa a acetilação do herbicida fosfinotricina e assim transforma o glufosinato de amônio em compostos inativos. A linhagem do milho modificado fica protegida contra os insetos e permite aos agricultores a utilização de herbicidas contendo fosfinotricina para o controle das ervas daninhas na cultura do milho (AGBIOS, 2005b).

O milho Bt11 foi criado através da transformação direta de DNA de protoplastos da linhagem de milho H8540 e regeneração em meio seletivo. Um único plasmídeo, designado pZO1502, foi utilizado na transformação e continha um gene *cry1Ab* sintético codificando a endotoxina Cry1Ab e um gene *pat* sintético (para permitir a seleção dos transformantes sobre ação do herbicida glufosinato de amônio). Antes da transformação, os plasmídeos vetores foram tratados com a endonuclease de restrição *NotI*, a fim de remover o gene *bla* do fragmento de DNA contendo os genes *cry1Ab* e *pat* (AGBIOS, 2005b).

O plasmídeo pZO1502 também continha o gene para β -lactamase (*bla*) incluído como marcador de seleção para monitoramento das células bacterianas transformadas. O gene *bla* codifica para uma β -lactamase que confere resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos, incluindo os de espectro moderado como a penicilina e a ampicilina. As células bacterianas que continham o plasmídeo pZO1502 foram selecionadas através de sua resistência à ampicilina. O gene *bla* foi retirado do plasmídeo vetor antes da transformação do tecido do milho (AGBIOS, 2005b).

A expressão constitutiva do gene *cry1Ab* é controlada pelo promotor 35S derivado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) modulado pelo íntron IVS6 (do gene 1S da enzima álcool desidrogenase do milho), e o sinal de poliadenilação 3' do gene *nos* da *A. tumefaciens*. A expressão constitutiva do gene *pat* estava sob o controle do promotor CaMV 35S, do íntron IVS2, e do terminador *nos* (AGBIOS, 2005b).

Outros componentes genéticos incorporados são o gene *lacZ* não-funcional, que codifica uma fração da enzima β -galactosidase; e a origem de replicação pUC

derivada do plasmídeo pBR322 (AGBIOS, 2005b).

Após a transformação as plantas foram regeneradas e o pólen dos milhos derivados do evento Bt11 de transformação foi utilizado para polinizar as flores de uma linhagem pura de milho. Os descendentes dos primeiros cruzamentos foram sucessivamente retrocruzados para avaliar as diferentes linhagens de milho que transportam o evento Bt11. Diversas variedades híbridas de milho foram obtidas a partir do evento milho Bt11 (AGBIOS, 2005b).

As análises com *Southern blot* confirmaram a presença de uma única cópia dos genes *cry1ab* e *pat* no milho Bt11 e a ausência de genes *bla*. A estabilidade do DNA inserido no milho Bt11 foi demonstrada por padrão de herança Mendeliana usando análise por *Southern blot*. A análise de segregação dos genes *cry1Ab* e *pat* durante várias gerações demonstraram que estavam estreitamente ligados, e eram sempre segregadas em conjunto. A análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA (RFLP) foi utilizada para determinar a localização dos novos genes no milho Bt11. Um único sítio de inserção foi mapeado no braço longo do cromossomo 8. (AGBIOS, 2005b)

b) Milho Bt176

O milho Bt - evento 176 - SYN-EV176-9 (176) (NaturGard™ e KnockOut™), foi desenvolvido pela Syngenta Seeds, Inc. através de uma modificação genética específica para ser resistente ao ataque da broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis*). Estas novas plantas produzem uma versão truncada da proteína Cry1Ab de ação inseticida, derivada de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* estirpe HD-1, e o evento 176 também é geneticamente modificado para expressar o gene *bar* clonado de uma bactéria do solo *Streptomyces hygroscopicus*, que codifica a enzima fosfotricina-N-acetiltransferase (PAT). A enzima PAT é útil como um marcador de seleção permitindo identificação de células vegetais transformadas, e também como uma fonte de resistência ao herbicida fosfotricina (também conhecido como glufosinato de amônio) (AGBIOS, 2006).

O evento 176 foi produzido por transformação biolística da linhagem pura CG00526 com dois plasmídeos. Um plasmídeo continha duas cópias do gene *cry1Ab* cada uma delas reguladas por diferentes sequências promotoras. A *open reading frame* (ORF) do gene *cry1Ab*, correspondente à sequência que codifica 648 aminoácidos N-terminais da proteína Cry1Ab nativos, foi modificada para otimizar a

expressão em células vegetais. A expressão de uma cópia do gene *cry1Ab* no tecido vegetal é regulada pelo promotor fosfoenolpiruvato carboxilase, enquanto a expressão da outra cópia do gene *cry1Ab* é controlada por um promotor específico de pólen isolado de milho. Ambos os genes utilizam seqüências 3' de poliadenilação do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV). Este plasmídeo também contém uma cópia do gene *bla* que codifica para a enzima β -lactamase sob controle de um promotor bacteriano. O gene *bla* não foi expresso em células vegetais, mas foi empregado como um marcador de seleção de colônias bacterianas para verificação da presença do plasmídeo vetor. O segundo plasmídeo continha uma cópia do gene *bar* da bactéria do solo *Streptomyces hygroscopicus* que codifica a enzima fosfotricina N-acetil tranferase (PAT). Esta enzima é utilizada como um marcador de seleção e confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio. A expressão constitutiva do gene *bar* estava sob o controle do promotor CaMV 35S. Além das seqüências que codificam as proteínas Cry1Ab e PAT, nenhuma outra seqüência de DNA passíveis de tradução foi introduzida no genoma vegetal (AGBIOS, 2006).

O gene *cry1Ab* sintético tem aproximadamente 65% de homologia de nucleotídeos com o gene nativo. A proteína truncada Cry1Ab contém a região de ação inseticida da Cry1Ab nativa como ficou demonstrado por análises *Western blot*, as quais apresentaram bandas semelhantes de aproximadamente 65 kDa tanto para as proteínas expressas pelo Evento 176 quanto às proteínas nativas. Três outras proteínas imunorreativas pesando aproximadamente 60, 40 e 36 kDa foram detectadas nas folhas de Evento 176, mas não no pólen. Foi sugerido que estas podem representar produtos resultantes da desagregação devido as proteólises ocorridas dentro do tecido foliar. A análise por *Southern blot* indicou que pode haver dois ou mais exemplares de cada plasmídeo integrados ao genoma do Evento 176. A análise por *Southern blot* confirmou também a presença do gene *bar* em todos os tecidos vegetais (AGBIOS, 2006).

Os dados de segregação e estabilidade demonstraram que os gene *cry1Ab* e *bar* foram fortemente ligados e herdados de forma estável dentro do genoma do milho evento 176. A produção de proteínas Cry1Ab e PAT, em folhas e pólen de plantas cultivadas em estufa demonstrou ser estável ao longo de quatro gerações sucessivas. As análises de segregação indicaram que a tolerância ao herbicida e a resistência aos insetos segregam de acordo com a herança Mendeliana. Um estudo de 3240 plantas indicou que apenas cinco plantas (0,15%) foram identificadas como

sendo tolerante ao glufosinato de amônio, mas suscetíveis aos danos causados pelas larvas de insetos (AGBIOS, 2006).

c) Milho MON810

O milho da linhagem MON810 - MON-ØØ81Ø-6 (MON810) - (nome comercial YieldGard®) foi desenvolvido pela Monsanto Company através de uma modificação genética específica para ser resistente ao ataque da broca europeia do milho (BCE; *Ostrinia nubilalis*). A nova variedade produz uma versão truncada da proteína de ação inseticida, Cry1Ab, derivado de *Bacillus thuringiensis*. As delta-endotoxinas, como a proteína Cry1Ab expressa no milho MON810, agem seletivamente pela ligação em sítios específicos localizados na borda em escova do epitélio intestinal de espécies de insetos sensíveis. Após a ligação formam-se poros que interrompem o fluxo iônico no intestino e, desta forma, causam paralisia e morte. A proteína Cry1Ab tem ação inseticida apenas para lepidópteros, bem como a sua especificidade de ação é diretamente atribuível à presença de sítios de ligação específicos nos insetos alvo (AGBIOS, 2005c).

O milho YieldGard® foi transformado através de bombardeamento de microprojéteis sobre tecidos embriogênicos de milho genótipo Hi-II com uma mistura de DNAs plasmidiais, PV-ZMBK07 e PV-ZMGT10. O plasmídeo PV-ZMBK07 continha o gene *cry1Ab* e o plasmídeo PV-ZMGT10 continha os genes *cp4 epsps* e *gox*. Ambos os plasmídeos continham o gene *nptII* sob o controle de um promotor bacteriano exigido para a seleção de bactérias que contenham os dois plasmídeos, e uma origem de replicação de um plasmídeo pUC (*ori-pUC*) necessários para a replicação de plasmídeos em bactérias (MONSANTO, 2002; AGBIOS, 2005c).

A sequência de codificação do gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*, estirpe HD-1 foi modificada para aumentar os níveis das proteínas Cry1Ab em plantas. O promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) e o íntron hsp70 (proteína do choque térmico) do milho regulam a expressão do gene *cry1Ab*. A região 3' não traduzida do gene para nopaline sintase (*nos*), isolada do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, finaliza a transcrição e dirige a poliadenilação do RNA mensageiro (mRNA). O plasmídeo contém também o gene para neomicina fosfotransferase (*nptII*), que codifica um marcador de seleção de origem bacteriana que foi utilizado para identificar células transformadas de milho durante o processo de desenvolvimento (MONSANTO, 2002).

A análise por *Southern blot* do milho evento MON810 demonstrou que uma única cópia funcional do gene *cry1Ab* foi integrado no genoma do milho. O gene *nptII* não foi integrado durante transformação. O gene *cry1Ab* é herdado conforme o padrão Mendeliano e é transmitido através do pólen, o que demonstra uma integração estável no genoma nuclear (MONSANTO, 2002).

1.3.1.2. Tolerância a herbicidas

O crescimento de plantas infestantes junto às culturas gera efeitos negativos à produção devido à concorrência das primeiras no que diz respeito à luz solar, água, espaço e nutrientes do solo, causando grandes perdas, motivo suficiente para justificar medidas de controle. O método empregado para o gerenciamento do crescimento dessas ervas daninhas é a utilização de herbicidas como glifosato, glufosinato de amônio, imidazolinona, sulfonilureia, sethoxydim e bromoxinil (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

A utilização de técnicas de modificação genética criou culturas que são, simultaneamente, tolerantes e resistentes a herbicidas. Esta tecnologia permite que os herbicidas sejam pulverizados sobre as culturas resistentes desde sua emergência até sua floração, tornando as aplicações mais eficazes (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

O glifosato é um herbicida sistêmico, de ação não seletiva, que inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase ou EPSPS) e impede que a planta forme aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas e também alguns metabólitos secundários, provocando a morte de plantas anuais e perenes (FUNGUETTO et al., 2004; SILVA, CARLIN & CAPUTO et al., 2006). É aplicado em pós-emergência e sua eficácia é dependente de processos como a retenção da molécula na superfície foliar, a penetração foliar, a translocação na planta até o sítio de ação e a inibição da enzima-alvo, a EPSPS.(MONQUERO et al., 2005).

A enzima EPSPS faz parte da via metabólica do chiquimato que está envolvida na produção de aminoácidos aromáticos e outros compostos aromáticos em plantas. Plantas convencionais tratadas com glifosato, podem não produzir os aminoácidos aromáticos necessários para sobreviver. A enzima EPSPS está presente em todos os vegetais, bactérias, fungos, mas não em animais, que não sintetizam seus próprios aminoácidos aromáticos (AGBIOS, 2005a).

Em diversos tipos de cultivo, o glifosato costuma ser pulverizado sendo, em geral, absorvido pela planta através de suas folhas e dos caulículos novos. O herbicida é, então, transportado por toda a planta, agindo nos vários sistemas enzimáticos, inibindo o metabolismo de aminoácidos. As plantas tratadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas e, devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002).

A tolerância ao glifosato, herbicida conhecido comercialmente por marcas como a Roundup[®], Rodeo[®] e Accord[®], é a característica transgênica mais comum na agricultura em todo o mundo. Culturas de soja, milho, algodão, canola, beterraba e, mais recentemente, trigo, foram geneticamente transformadas para serem tolerantes ao glifosato (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

As culturas geneticamente modificadas contêm o gene *cp4 epsps* isolado de *Agrobacterium* sp., estirpe CP4. O gene produz uma enzima que desempenha as funções de EPSP sintase, mas também não é inibido pelo glifosato. Em 1996, a Monsanto Company, indústria multinacional de agricultura e tecnologia, introduziu no mercado a primeira cultura tolerante ao glifosato: a soja Roundup Ready[®] (RR), sendo seguida de algodão, milho, beterraba e canola. Sob tratamento com esse herbicida, as plantas de soja não são afetadas, em virtude da ação continuada e sistemática dessa enzima alternativa, insensível ao glifosato (FERREIRA et al., 2004).

A soja tolerante a herbicida

A soja linhagem GTS (*glyphosate tolerant soybean*) 40-3-2, também conhecida como Roundup Ready[®] (RR) foi desenvolvida pela Monsanto Company para permitir a utilização do glifosato, o ingrediente ativo do herbicida Roundup[®], como uma opção para o controle de ervas daninhas nas plantações de soja (AGBIOS, 2005a).

A soja linhagem GTS 40-3-2 foi produzida por transformação biolística de células vegetais de soja, cultivar A5403, utilizando partículas de ouro. O plasmídeo PV-GMGT04 utilizado para transformação contém os genes que codificam para tolerância ao glifosato e para a produção de β -glucuronidase (gene *gus*), um marcador de seleção. A expressão do gene CP4 EPSPS é regulada por um promotor 35S (E35S) do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) acrescido de uma

seqüência codificante do peptídeo de trânsito do cloroplasto (CTP4) de *Petunia hybrida* (petúnia) e um elemento terminador de transcrição nopaline sintase (*nos* 3') proveniente de *A. tumefaciens*. O peptídeo de trânsito facilita a translocação da recém-traduzida EPSP sintase para dentro dos cloroplastos, local da biossíntese dos aminoácidos aromáticos e local de ação do glifosato (AGBIOS, 2005a).

A análise do genoma de DNA da soja GTS 40-3-2 por *Southern blot* demonstrou que haviam dois sítios de integração, um que continha uma cópia funcional do gene *cp4 epsps* e um segundo contendo um segmento não-funcional do mesmo gene. O gene *gus* não foi integrado no genoma hospedeiro e não foram introduzidos genes marcadores com resistência a antibióticos no material genético da soja GTS 40-3-2 (AGBIOS, 2005a).

Técnicas de *Southern blot*, caminharmento de cromossomos e sequenciamento de DNA foram utilizadas para analisar os locais de inserção. A maior inserção, contendo o gene funcional *cp4 epsps*, continha uma deleção na região de *enhance* do promotor E35S sendo que o restante do promotor E35S estava funcional. Uma única cópia do gene *cp4 epsps* (1365 pb) foi integrada e a análise da terminação 3' revelou um elemento de terminação transcricional *nos* 3' completo, o contrário do que havia sido anteriormente relatado. Além disso, uma seqüência adicional de 250 pb correspondente a uma parte do gene *cp4 epsps* foi recentemente detectada junto a terminação 3' do elemento *nos*, que não foi detectada em estudos anteriores (informação adicional apresentado pela Monsanto à autoridades reguladoras em 2000) (AGBIOS, 2005a).

As análises do segundo local de inserção mostraram a presença de uma seqüência de 72 pb correspondente a uma parte do gene *cp4 epsps*. As análises por sequenciamento, *Western* e *Northern blot* confirmaram que nem a seqüência adicional de 250 pb identificadas na primeira inserção e nem o fragmento inserido de 72 pb no segundo sítio são funcionais. As análises de *pedigree* confirmaram que estes segmentos do gene *cp4 epsps* estiveram presentes na soja GTS 40-3-2 durante todos os estudos de avaliação de risco e estão presentes em variedades comerciais (AGBIOS, 2005a).

1.3.1.3. Tolerância a estresse

O termo "estresse" aplicado aos vegetais normalmente refere-se a condições ambientais não-biológicas adversas, tais como a seca, inundações, mudanças de

temperatura (quente ou frio), salinidade, pH (acidez ou alcalinidade) e metais pesados. Destes, a seca e a salinidade são os mais comuns, este último agravado por práticas de irrigação (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

Felizmente, a biologia molecular por trás da expressão genética que provê a aclimação das plantas ao frio está sendo melhor caracterizada. Estudos sobre a regulação da expressão gênica de resistência ao frio em *Arabidopsis thaliana* têm mostrado que muitos dos genes são regulados por fatores de transcrição *C-repeating binding factor* (CBF) e o *Dehydration Responsive Element* (DREB1). Acredita-se que as proteínas de resposta ao frio que são regulados por CBF/ DREB1 aumentam a produção de proteínas estabilizadoras de membrana e de açúcares (MILLER, 2007).

A utilização de genes que codificam fatores de transcrição é um método promissor para a engenharia genética, porque muitas das maneiras das plantas se adaptarem ao frio, a seca, ao estresse oxidativo e a temperaturas extremas ocorre através do controle transcricional. Os fatores transcricionais que fazem parte do *regulon* para ajudar a prevenir os efeitos do stress abióticos foram superexpressos constitutivamente para promover uma maior tolerância. Muitos dos estudos realizados em lavouras comerciais foram baseados em *Arabidopsis*, porque não só as proteínas estruturais estão conservadas, mas também os *regulons* de tolerância ao estresse, o que faz dela um valioso modelo para investigação biotecnológica (MILLER, 2007).

Existem muitos genes que podem ser utilizados para modificar geneticamente culturas comerciais a fim de torná-las mais resistentes à condições adversas apresentadas pelo ambiente. Exemplos de culturas geneticamente modificadas são a canola tolerante ao frio, o tabaco tolerante ao aquecimento e o arroz tolerante ao estresse salino e à seca (ROHILA, JAIN & WUA., 2002; MILLER, 2007).

1.3.1.4. Aumento da utilização de nitrogênio

Parece haver relativamente poucas aplicações da biotecnologia para o melhoramento de algumas características das plantas como tamanho, rendimento, tamanho e números de sementes. Os cientistas, no entanto, criaram algumas melhorias. Um exemplo disso é a descoberta de um gene na alga *Chlorella sorokiniana* que tem uma enzima exclusiva que não foi encontrado em plantas

convencionais. A enzima glutamato desidrogenase amônio-induzida, aumenta a eficiência da incorporação de amônio em proteínas. Em algumas plantas, aumenta a eficiência da utilização de nitrogênio. A implicação prática é que menos adubo seria necessário para estas plantas crescerem. Quando o gene foi incorporado ao trigo aumentaram a produção da biomassa, a taxa de crescimento, assim como o número de espinhos na planta (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

1.3.1.5. Melhoramento da qualidade nutricional

As aplicações da engenharia genética para alterar as características qualitativas dos produtos, chamadas de características de *output*, são destinadas a aumentar o valor nutricional, modificar alérgenos e melhorar vários atributos funcionais para os consumidores. Modificações potencialmente benéficas exigirão um conhecimento mais profundo do metabolismo das plantas e métodos para conseguir mudanças eficazes nos parâmetros metabólicos desejados (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001; CHASSY et al., 2004).

A engenharia metabólica envolve tipicamente a reorientação das atividades celulares pela modificação das ações enzimáticas, dos transportes e das funções reguladoras da célula usando a tecnologia do DNA recombinante (DNAr) e outras técnicas. Como o sucesso desta abordagem depende da capacidade de mudar o metabolismo do hospedeiro, o seu desenvolvimento continuado dependerá de um conhecimento muito mais sofisticado do metabolismo vegetal, especialmente as nuances das interconectadas redes celulares (CHASSY et al., 2004).

Em conjunto com a compreensão do metabolismo vegetal, o desafio, em seguida, é a compreensão de como os componentes da dieta podem interagir com o metabolismo humano ou animal de modo a beneficiar a sua saúde e bem-estar. Este desafio é, pelo menos, tão complexo quanto a tarefa de aumentar ou diminuir a quantidade de uma proteína específica, ácidos graxos, ou outros componentes da planta propriamente dita. É de pouca utilidade a produção de uma planta com um suposto benefício nutricional a menos que o benefício realmente atue sobre a melhoria da saúde humana ou animal. O melhoramento das características nutricionais inclui o aumento na produção de proteínas e aminoácidos, carboidratos, fibras, óleos e lipídeos, vitaminas e minerais, nutracêuticos (alimentos que possuem propriedades nutricionais e terapêuticas – alimentos funcionais), a redução ou

eliminação de antinutrientes, alérgenos ou substâncias que causem intolerância alimentar, toxinas, entre outras características (CHASSY et al., 2004).

Um exemplo de alimento que teve a sua qualidade nutricional alterada é o arroz chamado de *Golden Rice* ou arroz dourado, que foi geneticamente modificado para ter aumentada a quantidade de ferro e beta-caroteno (o precursor da vitamina A), e recebeu considerável publicidade pelo seu potencial benéfico às nações em desenvolvimento, nas quais as deficiências nutricionais são responsáveis por muitos problemas de saúde (PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY, 2001).

1.3.1.6. Plantas como produtora de Fármacos e como Biofábricas

Uma outra possibilidade é que algumas plantas transgênicas sirvam como fábricas de produtos farmacêuticos e industriais de modo a torná-los mais abundantes, mais diversificados e mais baratos. Exemplos de produtos farmacêuticos produzidos por essas plantas são a avidina (usada em diagnósticos médicos), a tripsina (enzima utilizada na produção de fármacos), a hiridina (uma proteína humana de ação anticoagulante), um anticorpo aplicado topicamente que previne a transmissão do herpes vírus e uma vacina em potencial contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os produtos industriais incluem enzimas para utilização em indústrias, cosméticos e plásticos, substituindo produtos derivados de petróleo (STEWART & McLEAN, 2004).

1.4. Situação Global das Lavouras Geneticamente Modificadas

Nos últimos anos, houve um crescimento dramático e gradual na superfície de área plantada com culturas transgênicas, sendo os Estados Unidos os maiores produtores e consumidores destas com mais de dois terços da produção mundial (CARDARELLI et al., 2005).

Embora as primeiras culturas geneticamente modificadas comercializadas tenham sido plantadas em 1994 (tomates), 1996 foi o primeiro ano em que uma área significativa (1,66 milhões de hectares) de culturas foi plantada contendo características geneticamente modificadas. Desde então, tem havido um aumento dramático em plantações e em 2005/06, a área mundial plantada atingiu quase 87,2 milhões de hectares. Isto é igual a cinco vezes a superfície agrícola total ou dezenove vezes o total de área cultivável do Reino Unido (JAMES, 2006).

Durante o período de 1996 a 2006, a proporção da área global de lavouras biotecnológicas plantadas por países em desenvolvimento aumentou consistentemente a cada ano. Quarenta por cento da área global de lavouras biotecnológicas em 2006, que equivale a 40,9 milhões de hectares, foi cultivado nos países em desenvolvimento, onde o crescimento entre 2005 e 2006 foi substancialmente maior (7,0 milhões de hectares ou um crescimento de 21%) do que em países desenvolvidos (5,0 milhões de hectares ou 9% de crescimento). O impacto coletivo crescente dos cinco países principais em desenvolvimento usuários da biotecnologia (Índia, China, Argentina, Brasil e África do Sul) representando todos os três continentes do Sul, da Ásia, da América Latina e da África, é uma tendência de continuidade importante com implicações para a futura adesão e aprovação das lavouras biotecnológicas no mundo inteiro (JAMES, 2006).

Do início da produção e comercialização de lavouras geneticamente modificadas até os dias atuais, a tolerância a herbicida tem se mantido, seguido pela resistência a insetos e o tratamento combinado com os dois referidos genes. Em 2006, a tolerância a herbicida, empregada na soja, no milho, na canola, no algodão e na alfafa ocupou 68% ou 69,9 milhões de hectares dos 102 milhões de hectares de agricultura biotecnológica no mundo, o plantio de culturas Bt foi realizado em 19,0 milhões de hectares (19%) e 13,1 milhões de hectares (13%) com tratamento combinado do produto Bt e tolerância a herbicidas. O grupo de produtos com genes combinados foi o de maior crescimento entre 2005 e 2006, 30%, em comparação aos 17% do resistente a insetos e 10% do tolerante a herbicidas (JAMES, 2006).

A soja biotecnológica continuou sendo a cultura biotecnológica mais importante em 2006, ocupando 58,6 milhões de hectares (57% da área global de agricultura biotecnológica), seguidas por 25,2 milhões de hectares de milho (25%), 13,4 milhões de hectares de algodão (13%) e 4,8 milhões de hectares de canola (5%) (JAMES 2006).

Dos 22 países com lavouras biotecnológicas, 11 são de países em desenvolvimento e 11 de desenvolvidos, os quais estão descritos a seguir em ordem decrescente de área plantada: EUA, Argentina, Brasil, Canadá, Índia, China, Paraguai, África do Sul, Uruguai, Filipinas, Austrália, Romênia, México, Espanha, Colômbia, França, Irã, Honduras, República Tcheca, Portugal, Alemanha, e Eslováquia. Os EUA, seguidos pela Argentina, o Brasil, o Canadá, a Índia e a China, continuaram a ser os principais usuários no nível global das lavouras biotecnológicas, com 54,6 milhões de hectares plantados (53% da área global de

biotecnologia) dos quais aproximadamente 28% eram tratamentos combinados com dois ou três genes. Os tratamentos combinados, atualmente utilizados nos EUA, Canadá, Austrália, México, África do Sul e Filipinas, são uma tendência importante e crescente no futuro, o que vai de encontro às múltiplas restrições à produção observadas pelos agricultores (BROOKES & BARFOOT, 2006).

O maior aumento absoluto na área de lavouras biotecnológicas em 2006 foi nos EUA, estimado em 4,8 milhões de hectares, seguidos pela Índia com 2,5 milhões de hectares, o Brasil com 2,1 milhões de hectares, e a Argentina e a África do Sul empatando em 0,9 milhões de hectares cada. O maior aumento proporcional ou aumento percentual foi na Índia, alcançando 192% (quase três vezes mais, a partir dos 1,3 milhões de hectares em 2005 para 3,8 milhões de hectares em 2006) seguida de perto pela África do Sul com 180% com um aumento impressionante em sua área de milho biotecnológico branco e amarelo, e as Filipinas com um aumento de 100%, também devido ao aumento significativo na sua área de plantio de milho Bt (BROOKES & BARFOOT, 2006).

Enquanto 22 países plantaram lavouras biotecnológicas comercializadas em 2006, 29 outros países, totalizando 51, concederam, desde 1996, aprovações regulatórias para lavouras biotecnológicas serem importadas, utilizadas em alimentos e forragem, e liberadas no meio ambiente. Um total de 539 aprovações foi concedido para 107 eventos de 21 tipos de cultura. Sendo assim, os produtos biotecnológicos podem ser importados, utilizados em alimentos e forragens e liberados no meio ambiente em 29 países, inclusive nos maiores países importadores de alimentos como o Japão, que não planta lavouras biotecnológicas. Dos 51 países que concederam aprovações para o plantio de lavouras biotecnológicas, os EUA encabeçam a lista, seguidos pelo Japão, Canadá, Coreia do Sul, Austrália, Filipinas, México, Nova Zelândia, União Européia, e China. O milho tem a maioria dos eventos aprovados (35), seguido pelo algodão (19), a canola (14) e a soja (7). O evento que mais tem recebido aprovação regulatória no mundo é o da soja tolerante a herbicida GTS-40-3-2 com 21 aprovações, seguido pelo milho resistente a insetos (MON810) e o milho tolerante a herbicidas (NK603), ambos com 18 aprovações, e o algodão resistente a insetos (MON 531/757/1076) com 16 aprovações no mundo inteiro (BROOKES & BARFOOT, 2006).

O aumento da produtividade, a maior resistência às doenças e às pragas, o decréscimo no tempo necessário para produzir e distribuir novos cultivares de plantas, provavelmente com produção de novos organismos vegetais e animais, são

alguns ícones que a biotecnologia e a engenharia genética estão criando. Alguns questionamentos foram levantados e postos em discussão. De que modo se utilizará a biotecnologia? Quais são os problemas que procura resolver e quem se beneficiará da tecnologia? Quais são as conseqüências ambientais para a saúde pública? (CAVALLI, 2001).

1.5. Avaliação de Risco de Transgênicos

A inserção de novas construções no genoma de um organismo supõe a melhora de suas propriedades, úteis ao ser humano, e a redução de custos da produção. No entanto, junto com as novas características, os organismos adquirem um conjunto de novas qualidades devido às atividades pleiotrópicas da nova proteína e as propriedades da construção, incluindo instabilidade e seus efeitos regulatórios sobre os genes vizinhos. Todos os fenômenos e eventos indesejáveis resultantes do crescimento e consumo dos OGM podem ser classificados em três grupos de risco: alimentares, ecológicos e agrotecnológicos (KULIKOV, 2005).

1- Riscos alimentares

- a) Efeitos imediatos de proteínas tóxicas ou alergênicas do OGM;
- b) Riscos causados por efeitos pleiotrópicos das proteínas transgênicas no metabolismo da planta;
- c) Riscos mediados pela acumulação de herbicidas e seus metabólitos nas variedades e espécies resistentes;
- d) Risco de transferência horizontal das construções transgênicas, tanto para o genoma de bactérias simbióticas de humanos e animais.

2- Riscos ecológicos

- a) Erosão da diversidade das variedades de culturas devido à ampla introdução de plantas GM derivadas de um grupo limitado de variedades parentais;
- b) Transferência não controlada de construções, especialmente daquelas que conferem resistência a pesticidas, pragas e doenças, devido a polinização cruzada com plantas selvagens de ancestrais e espécies relacionadas. Os

- possíveis resultados são o declínio na biodiversidade das formas selvagem do ancestral;
- c) Risco de transferência horizontal não controlada das construções para a microbiota da rizosfera;
 - d) Efeitos adversos na biodiversidade devido a proteínas transgênicas tóxicas, afetando insetos não alvo assim como a microbiota do solo, rompendo desta forma a cadeia trófica;
 - e) Risco de rápido desenvolvimento de resistência às toxinas implantadas no transgênico por insetos fitófagos, bactérias, fungos, e outras pragas devido à pesada pressão seletiva;
 - f) Riscos de cepas altamente patogênicas de fitovírus emergirem devido às interações do vírus com as construções transgênicas que são instáveis no genoma dos organismos receptores e, portanto são alvos mais prováveis para recombinação com DNA viral.

3- Riscos Agrotecnológicos

- a) Riscos de mudanças imprevisíveis em propriedades e características não alvo das variedades GM, e a efeitos pleiotrópicos de um gene introduzido;
- b) Riscos de mudanças transferidas nas propriedades de variedade GM que deveriam emergir depois de muitas gerações devido à adaptação do novo gene ao genoma, com manifestação da nova propriedade pleiotrópica e as mudanças já citadas;
- c) Perda da eficiência do transgênico resistente a pragas devido ao cultivo extensivo das variedades GM por muitos anos;
- d) Possível manipulação da produção de sementes pelos donos da tecnologia “terminator”.

A liberação de lavouras geneticamente modificadas (GM) no ambiente e no mercado levantou diversas questões a respeito da segurança desses produtos. A complexidade das discussões é decorrente de dois fatores principais: por um lado, a base de conhecimentos científicos sobre as implicações e impactos da liberação em larga escala de plantas transgênicas para o cultivo comercial é ainda insuficiente; por outro lado, a questão das plantas transgênicas enseja uma abordagem inter e multidisciplinar, uma vez que os impactos são diferenciados, os conflitos de

interesses são múltiplos e o diálogo que apenas recentemente vem se tornando público (NODARI & GUERRA, 2001; MAZZA et al., 2005).

A grande questão que vem sendo levantada é o quão seguras são essas tecnologias e se estão de acordo com o Guia Internacional para Segurança em Biotecnologia (IGSB), aceito pelo Programa Ambiental das Nações Unidas. Atualmente os argumentos dos partidários do princípio da precaução forçam os governos de muitos países na União Européia, Ásia e África a modificar suas políticas e desistir da produção de variedades GM (KULIKOV, 2005).

Portanto, é necessária uma avaliação de riscos alimentares com base científica para que os alimentos GM ou derivados possam ser utilizados como alimento convencional. Os perigos potenciais dos OGM podem estar associados com toxicidade, alergenicidade, alterações nutricionais e efeitos antinutrientes e a possibilidade remota de transferência horizontal de genes (RHEE et al., 2005)

Nas duas últimas décadas, organizações governamentais e intergovernamentais têm planejado estratégias e protocolos para o estudo da segurança de alimentos derivados de cultivos geneticamente modificados. Os testes de segurança são conduzidos caso a caso e modelados para as características específicas das culturas modificadas, e às mudanças que foram introduzidas através de técnicas de engenharia genética (KÖNIG et al., 2004).

O maior problema na análise de risco de OGM é que seus efeitos não podem ser previstos na sua totalidade. Os riscos à saúde humana incluem aqueles inesperados, alergias, toxicidade e intolerância. No ambiente, as conseqüências são a transferência lateral (horizontal) de genes, a poluição genética e os efeitos prejudiciais aos organismos não alvo (NODARI & GUERRA, 2003).

A avaliação de novos alimentos, incluindo os OGMs, é realizada através da comparação destes com seu análogo convencional com histórico de uso seguro num estudo denominado de equivalência substancial (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003a). A aplicação desse estudo é feita através da observação de características agrônômicas, morfológicas e de composição química, incluindo macro e micro nutrientes, toxinas, antinutrientes, permitindo a identificação de diferenças entre as cultivares GM e os análogos convencionais, que são normalmente as cultivares parentais das GM. Além disso, é verificado se há alterações nos parâmetros composicionais e também as principais etapas do processo metabólico. Mudanças significativas nesses parâmetros são indicativas de alterações na cultivar, que precisam ser avaliadas devido ao potencial em produzir

efeitos adversos na saúde humana. Entretanto, as novas variedades de plantas normalmente não são submetidas a extensivos testes de segurança alimentar como estudos em animais, que são típicos em estudos de aditivos químicos e resíduos de pesticidas em alimentos (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003b; KÖNIG et al., 2004).

A avaliação da segurança deve ser baseada nos riscos potenciais impostos pelo produto obtido. Assim, a avaliação deve levar em consideração as características do doador, do recipiente, ou, quando apropriado, do organismo parental. Devem ainda ser avaliadas as características e a utilização pretendida do OGM, incluindo a escala e a frequência das introduções e considerações ambientais e de saúde (NODARI & GUERRA, 2001).

Conforme o Codex Alimentarius, para os alimentos derivados de plantas geneticamente modificadas, a avaliação de risco deve seguir os seguintes critérios (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003b):

- a) Descrição da planta geneticamente modificada;
- b) Descrição da planta hospedeira e seu histórico de uso seguro;
- c) Descrição do organismo doador do gene de interesse;
- d) Descrição da modificação genética;
- e) Caracterização da modificação genética;
- f) Avaliação da segurança: substâncias expressas, análise dos componentes, avaliação dos metabólitos, modificações nutricionais e processamento do alimento.

a) Descrição da planta geneticamente modificada:

Esta etapa visa identificar a cultivar, os eventos de transformação, o tipo e o propósito da modificação. A descrição deve ser suficiente para esclarecer a natureza do alimento que será submetida à avaliação de segurança (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003b).

b) Descrição da planta parental e seu histórico de uso seguro:

A descrição da cultivar parental deve incluir informações sobre a origem, genótipo, fenótipo, diversidade, e histórico de uso seguro da parental. A caracterização da cultivar parental, que normalmente não é geneticamente

modificada, serve de guia para a escolha dos parâmetros a serem analisados por comparação com a cultivar GM. Os parâmetros testados devem incluir indicadores do desenvolvimento da cultivar, fenótipo, performance agrônômica, bem como seus nutrientes endógenos e seus potenciais antinutrientes ou substâncias biologicamente ativas, toxinas e alérgenos alimentares. Um entendimento da variação natural das principais características agrônômicas e composicionais da cultivar em diferentes regiões geográficas e sob diferentes condições de cultivo é essencial para interpretar a comparação da cultivar GM com a cultivar de comparação (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003a; KÖNIG et al., 2004).

c) Descrição do organismo doador do gene de interesse

A descrição do organismo doador deve incluir a classificação e a taxonomia nos padrões internacionais e deve também remeter qualquer evidência de potencial de toxicidade, de alergenicidade ou de patogenicidade. Uma lista de toxinas, alérgenos, substâncias bioativas e antinutrientes de origem natural contidas no organismo doador devem ser descritas (KÖNIG et al., 2004).

A documentação sobre o histórico de uso seguro e exposição ao organismo doador deve ser citada, quando possível. Essa informação, juntamente com o entendimento da função de qualquer seqüência de DNA recombinante usada no processo de transformação, facilita a identificação do perigo de “novos elementos” que são transferidos para a cultivar. O DNA introduzido deveria mostrar-se não prejudicial à saúde humana. Se o doador for alergênico conhecido, supõe-se que os genes transferidos codificam alérgenos até que o contrário seja provado (KÖNIG et al., 2004).

Um exemplo de proteínas com o potencial de alergenicidade é o da introdução da subunidade 2S-albumina da castanha-do-Brasil (*Bertholettia excelsa*), para ser expressa em soja. O objetivo da transformação era produzir uma soja com maiores níveis de metionina, aumentando o valor nutricional do produto, que seria utilizado como ração animal. No entanto, muitos consumidores apresentam reações alérgicas à castanha. O soro destes consumidores alérgicos apresentou reatividade com a proteína. Desta forma, o desenvolvimento da soja rica em metionina foi cancelado. Este cancelamento foi devido à alergenicidade apresentada pela castanha e não ao gene que codifica para a proteína alergênica (OLIVEIRA, WATANABE & MARIN, 2004).

d) Descrição da modificação genética

A descrição do processo de transformação deve incluir informação sobre o método de transformação; sobre o DNA utilizado para modificar a planta, incluindo a fonte (bactéria, vírus, planta, etc.), a identidade e a função; sobre organismos hospedeiros intermediários utilizados para produzir ou processar o DNA para a transformação do organismo receptor. Além disso, devem ser fornecidas informações sobre o DNA a ser introduzido, incluindo a caracterização de todos os componentes genéticos como genes marcadores, regulatórios, e outros elementos que afetem a função do DNA; tamanho e identidade, localização e orientação da seqüência no vetor e na construção final, e a função (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003b).

Uma descrição passo a passo da construção do vetor deve fornecer detalhes sobre todos os organismos utilizados para a amplificação do DNA vetor. Deve também fornecer informações sobre a função de todos os elementos genéticos dos vetores de transformação, incluindo a seqüência codificadora, sinais promotores e de terminação. Um mapa de restrição com as enzimas mais relevantes deve também estar disponível. Provas de ausência de fragmentos não intencionais no vetor devem ser solicitadas (KÖNIG et al., 2004).

Normalmente a transformação é feita ou por infecção por *A. tumefaciens*, ou pela biobalística. Na utilização da bactéria *Agrobacterium*, o risco de transferência do fragmento desejado ser ao acaso é relativamente baixo, mas deve ser descrita a cepa doadora assim como os plasmídeos da cepa, além de se avaliar o risco da presença de outras seqüências. Na utilização de transformação direta como a biobalística, a preparação do DNA usado para a transformação deve ser verificada quanto a seqüências contaminantes de DNA cromossômicos e plasmidiais de bactérias (KÖNIG et al., 2004).

e) Caracterização da modificação genética

A caracterização molecular do DNA recombinante em cultivares GM normalmente é feita de acordo com as normas internacionais sobre a avaliação de segurança. As informações e dados devem ser fornecidos para haver a identificação

e caracterização do perigo potencial resultante da transformação da planta (KÖNIG et al., 2004).

Para a caracterização da modificação genética, deve ser determinado o número de inserções e de cópias das seqüências de DNA introduzidas, além de se pesquisar quais os sítios de inserção dos transgenes, utilizando técnicas de biologia molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), *Southern blot*, *Northern blot*, entre outros. A estabilidade da inserção deve ser verificada por mais de 5 gerações (KÖNIG et al., 2004).

Além disso, devem ser obtidas informações sobre a seqüência de DNA da junção entre o genoma da planta e o inserto, quando existem “open reading frames” (ORFs) ou promotores incompletos dentro do DNA inserido que pode provocar o aparecimento de proteínas fundidas (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003a).

Rang, Linke e Jansen (2005) caracterizaram regiões de flaqueamento do gene *cp4 epsps*, demonstrando a formação de um fragmento de DNA com mais de 250 pares de bases. Este fragmento estaria localizado na região “downstream” do terminador *nos* (nopalina sintase) do gene introduzido. Uma análise quanto à importância funcional desse fragmento adicional foi realizada apontando que pelo menos 150 pares de base dessa região do DNA são transcritos na soja Roundup Ready. Os produtos transcritos são processados resultando em quatro variantes de RNA, oriundos de DNA cujo terminador *nos* foi completamente deletado. A deleção resulta na geração de ORFs que podem codificar proteínas EPSPS fundidas com região N-terminal que não apresentam homologia com as proteínas do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A partir do momento em que o terminador *nos* foi introduzido como região reguladora em vários outros OGM, os produtos e as variantes de RNA podem ser transcritos nestas safras transgênicas.

f) Avaliação da segurança: substâncias expressas, análise dos componentes, avaliação dos metabólitos, modificações nutricionais e processamento do alimento:

Os efeitos provocados por alimentos GM sobre a saúde são geralmente comparáveis aos riscos conhecidos associados aos alimentos convencionais, e incluem, por exemplo, o potencial de alergenicidade e toxicidade de componentes presentes, a qualidade nutricional e segurança microbiológica do alimento, e os possíveis efeitos secundários da expressão do gene ou o rompimento do material

genético do receptor ou de suas vias metabólicas, incluindo composição de macronutrientes, micronutrientes, antinutrientes, toxinas endógenas, alérgenos e substâncias fisiologicamente ativas (FOOD SAFETY DEPARTMENT/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Qualquer alteração inesperada nos níveis de substâncias detectadas durante a análise composicional requer identificação, caracterização e avaliação de risco. Em todos os casos, os níveis de expressão precisam ser estabelecidos para assegurar que não sejam prejudiciais à saúde. Além disso, as avaliações de toxicidade devem ser feitas caso a caso, dependendo da substância a ser avaliada, verificando a exposição humana à substância ou à similares bem como o histórico de uso seguro. Em caso de novas proteínas ou se os dados disponíveis sugerem a existência de qualquer causa para preocupação, um estudo deve ser feito utilizando animais de laboratórios (KÖNIG et al., 2004).

1.5.1. Efeitos não Intencionais de Alimentos GM sobre a Saúde Humana

Quando os OGMs são desenvolvidos, algumas características existentes nos organismos podem ser alteradas não intencionalmente, afetando a expressão de componentes constitutivos. O transgene pode integrar dentro ou em regiões adjacentes dos genes da planta e perturbar sua expressão, seja pelo aumento ou pela diminuição dessa expressão. O transgene pode ser expresso de uma maneira tardia através da ação dos promotores em genes adjacentes da planta ou pela alteração das ORFs do gene da planta. O rearranjo durante a integração pode criar ORFs alteradas que permitem ao transgene sintetizar produtos não intencionais (HASLBERGER, 2006).

Efeitos não intencionais, como a elevação dos níveis de constituintes anti-nutricionais ou tóxicos em alimentos, já foram caracterizados em organismos obtidos através de métodos convencionais de reprodução. Estes podem ter possibilidades de melhoramento genético (e epigenético – alterações induzidas pelo ambiente que podem afetar a expressão do gene, sem mudar a seqüência de DNA) e de instabilidades, como o silenciamento de genes (FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Esses efeitos podem aumentar a probabilidade de efeitos pleiotrópicos não intencionais (afetando mais de uma característica fenotípica), assim como de efeitos

epistáticos (interação do gene inserido com os outros genes) (FOOD SAFETY DEPARTMENT/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Os efeitos não intencionais podem ser classificados como efeitos inseridos, ou seja, relacionados à posição de inserção do gene de interesse, ou como efeitos secundários, associados com a interação entre os produtos expressos do gene introduzido e as proteínas endógenas e metabólitos. Métodos adequados para a avaliação de efeitos não intencionais precisam ser estudados caso-a-caso, considerando fatores tóxicos e antinutricionais não intencionais, através de uma análise dos constituintes e de características GM (FOOD SAFETY DEPARTMENT/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

1.5.1.1. Modificações do metabolismo e efeitos pleiotrópicos de proteínas transgênicas.

Riscos alimentares podem surgir de efeitos pleiotrópicos de proteínas transgênicas e através dos efeitos regulatórios das construções inseridas. Por mais rigorosos que sejam os guias para validação das variedades transgênicas, não é fácil distinguir alterações não desejáveis no metabolismo e a atividade de várias proteínas, pois os pesquisadores não sabem exatamente quais características devem ser investigadas. Essas alterações podem ser quantitativas ao invés de qualitativas. Por exemplo, em algumas plantas tolerantes ao estresse ambiental são inseridos genes para a expressão da arginina descarboxilase. Devido à super-expressão desta enzima, o tabaco transgênico e algumas cultivares de arroz acumulam altos níveis de agmatina, um metabólito imediato da arginina, e em alguns casos, metabólitos secundários da arginina como a putrecina, espermidina e espermina. A agmatina e seus derivados são substâncias biologicamente ativas que podem interagir com receptores adrenérgicos, medazolínicos e de glutamato; desta forma funcionam como neuromediadores, ativando mitoses, e facilitando a formação de tumores. Como não são proteínas, esses compostos podem ser assimilados facilmente pelo organismo humano (KULIKOV, 2005).

Para avaliar a segurança da utilização de plantas geneticamente modificadas como fonte alimentícia, é vital estabelecer sua capacidade de acumular substâncias tóxicas para humanos e animais e reconhecer se os efeitos pleiotrópicos e as construções transgênicas podem levar ao acúmulo de outros metabólitos nocivos e alergênicos. Considere que a maioria dos pesticidas é tóxica para humanos, como

por exemplo, o glifosato que é carcinogênico e pode provocar linfoma (KULIKOV, 2005).

Recentemente, estudos sobre o efeito da ingestão de soja Roundup Ready em ratos demonstraram em análises ultraestrutural e imunocitoquímica, alterações em células acinares do pâncreas (redução de fatores de *splicing* do núcleo e do nucléolo e acúmulo de grânulos de pericromatina); em testículos de ratos (aumento do número de grânulos de pericromatina, diminuição da densidade de poros nucleares, alargamento do retículo endoplasmático liso das células de Sertoli), havendo a possibilidade de tais efeitos estarem relacionados ao acúmulo de herbicida presente na soja resistente, além de alterações em hepatócitos (modificações na forma do núcleo, aumento do número de poros na membrana nuclear, alterações na forma arredondada do nucléolo, indicando aumento do metabolismo) sendo potencialmente reversíveis neste último grupo de células (MALATESTA et al., 2002a; MALATESTA et al., 2002b; MALATESTA et al., 2003; MALATESTA et al., 2005; VECCHIO et al., 2004).

1.5.2. Transferência horizontal.

A transferência horizontal de genes é bem conhecida entre as bactérias. No curso da evolução, as bactérias trocavam facilmente fragmentos de seu genoma com outras bactérias e com eucariotos, mantendo esta capacidade até os dias atuais. Essa propriedade da bactéria é relevante para o estudo de risco alimentar e ecológico utilizando OGM (KULIKOV, 2005).

A probabilidade da inserção de construções transgênicas de plantas em genomas de mamíferos ou humanos é muito pequena, e os eucariotos superiores possuem muitas barreiras que evitam eficientemente a transferência horizontal de genes. Mesmo quando ocorre a transferência, a célula transformada, no estágio terminal de diferenciação, não se prolifera. A transferência da construção do transgênico para gametas é praticamente impossível devido a barreira hematotesticular impenetrável a grandes moléculas. No entanto, deve-se ter em mente que a microbiota intestinal é formada por bactérias endossimbiontes que podem adquirir genes através da transferência horizontal. De acordo com os protocolos de rotina, a seleção dos transgênicos é feita através da inserção de fragmentos de DNA contendo genes de resistência a antibióticos (genes marcadores). A transformação de uma bactéria simbiótica e patogênica por

recombinação pode resultar no desenvolvimento de uma microbiota resistente a antibióticos (KULIKOV, 2005).

Tecnologias de transformação alternativa que não resultam em genes marcadores com resistência a antibióticos devem ser usadas para o desenvolvimento de plantas recombinantes para que estas tecnologias estejam disponíveis e demonstrem-se seguras (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003b)

A transferência de genes de plantas e seus produtos alimentícios para os microorganismos intestinais ou para as células humanas é considerada uma possibilidade rara, pois muitos eventos complexos e improváveis teriam que ocorrer consecutivamente. No entanto, a possibilidade desses eventos ocorrerem não pode ser completamente descartada (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003b; FOOD SAFETY DEPARTMENT/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Portanto o conceito de equivalência substancial é o ponto inicial e conceito guia para a avaliação de segurança alimentar, e não o seu ponto final. Críticos do conceito de equivalência substancial reclamam que os testes em curso não são suficientes para se fazer suposições sobre efeitos não intencionais ou não esperados e, não possibilita excluir a ocorrência de efeitos em longo prazo que resultam da exposição humana prolongada a essas cultivares que podem conter alterações composicionais súbitas difíceis de detectar (KÖNIG, 2004).

Embora sejam sugeridos vários tópicos bastante detalhados discriminando cada etapa de avaliação de risco a ser realizada em alimentos geneticamente modificados, os dados obtidos sobre avaliações de risco já processadas até a presente data, não indicam nenhuma alteração ocasionada pelo gene inserido. O que se observa são relatos sobre os efeitos não intencionais, sejam eles pleiotrópicos ou provocados pela característica em evidência (resistência a insetos e tolerância a herbicidas) atuando sobre a saúde humana (COSTA et al., 2007).

Apesar de não haver evidências sobre esta ação direta do gene, não se deve descartar maiores estudos sobre os OGMs e os seus riscos diretos e indiretos sobre a saúde da população, já que a liberação destes para a comercialização e consumo provocou um grande aumento na produção mundial de OGMs, estando estes presentes como ingredientes em parte representativa dos alimentos disponíveis no mercado para consumo humano e animal. Deve-se lembrar que as avaliações de riscos de alimentos GM somente ocorreram depois de sua liberação comercial e que é necessário agir cautelosamente confrontando a necessidade das empresas

multinacionais em expor seus produtos e o princípio da precaução, visando sempre proporcionar o bem estar social até que os impactos desta nova tecnologia sobre a saúde humana e o meio ambiente sejam devidamente avaliados (COSTA et al., 2007).

1.6. Políticas Internacionais de Rotulagem de Produtos que Contém Organismos Geneticamente Modificados

Os sistemas de segurança alimentar, que incluem instituições, políticas, leis e diretrizes para avaliações, evoluem continuamente ao longo do tempo. A evolução dos sistemas de segurança dos alimentos em cada jurisdição é afetada tanto pela ciência quanto pela sociedade: os avanços científicos aumentam a nossa compreensão das implicações dos alimentos na saúde e levam à adoção de novas tecnologias de produção de alimentos agrícolas, alguns dos quais requerem regulamentação. A alteração dos valores sociais pode levar a mudanças na política de defesa dos consumidores e nas regulamentações. As regulamentações podem, por sua vez, afetar tanto a inovação quanto a percepção do risco. A Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) compilou descrições dos sistemas nacionais de segurança alimentar dos seus vinte e nove Estados membros; essas descrições também endereçam especificamente as abordagens nacionais para a regulação e avaliação de alimentos produzidos a partir de culturas geneticamente modificadas (ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2003).

Durante os últimos dez anos, mais de 40 países adotaram políticas de rotulagem para alimentos geneticamente modificados, mas as características das regulamentações e seu grau de execução variam enormemente. Embora a grande maioria dos países pertencentes à OECD tenham implementado algum tipo de política de rotulagem, poucos países em desenvolvimento introduziram leis para rotulagem, ou mesmo as implementaram (GRUÈRE & RAO, 2007).

Após a entrada em vigor do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança em 11 de setembro de 2003, houve uma necessidade urgente de aquisição de informações e capacitação nesta área para a implementação de políticas de biossegurança e para tomadas de decisões por partes dos governos em níveis nacionais, regionais e internacionais (ALEXANDROVA, GEORGIEVA & ATANASSOV, 2005).

1.6.1. A Convenção sobre Diversidade Biológica e o Protocolo de Cartagena

Em 1992 uma Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento foi realizada no Rio de Janeiro. Nesta conferência, 172 governos acordaram sobre vários documentos, entre os quais estavam a Agenda 21 e a Convenção sobre a Diversidade Biológica. Os objetivos da Convenção são a conservação da diversidade biológica, a utilização sustentável dos seus componentes e a partilha justa e equitativa dos benefícios decorrentes da utilização dos recursos genéticos (ALEXANDROVA, GEORGIEVA & ATANASSOV, 2005).

O Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança é o primeiro acordo firmado no âmbito da Convenção sobre Diversidade Biológica (CBD). Visa assegurar um nível adequado de proteção no campo da transferência, da manipulação e do uso seguro dos organismos vivos modificados (OVMs) resultantes da biotecnologia moderna que possam ter efeitos adversos na conservação e no uso sustentável da diversidade biológica, levando em conta os riscos para a saúde humana, decorrentes do movimento transfronteiriço (CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA, 2006).

O Protocolo foi adotado em 2000 e entrou em vigor em setembro de 2003. É o primeiro instrumento juridicamente vinculativo global incidindo sobre OVM. O protocolo estabelece que haja um prévio acordo que exige, antes da primeira introdução intencional no ambiente de uma parte importadora, a notificação do partido de exportação que contenham certas informações, o reconhecimento da sua recepção e o consentimento escrito da parte de importação. Critérios são fornecidos para a tomada de decisões sobre a importação, em especial, que deve ser feita de acordo com uma avaliação de risco (ALEXANDROVA, GEORGIEVA & ATANASSOV, 2005).

A adoção do Protocolo pelos Países-Partes da Convenção constitui-se em um importante passo para a criação de um marco normativo internacional que leva em consideração as necessidades de proteção do meio ambiente e da saúde humana e da promoção do comércio internacional. Da mesma forma, cria uma instância internacional para discutir os procedimentos que deverão nortear a introdução de organismos vivos modificados em seus territórios. Neste contexto, cabe salientar que o Protocolo incorpora o Princípio da Precaução (onde existam ameaças de riscos sérios ou irreversíveis, a falta de completa certeza científica não deve ser utilizada

como razão para o adiamento de medidas eficazes em termos de custos para evitar a degradação ambiental), um dos pilares mais importantes desse instrumento e que deve nortear as ações políticas e administrativas dos governos (CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA, 2006).

O Protocolo fornece guias de avaliações de risco e medidas para gerenciamento do risco. As avaliações de risco devem ser realizadas de maneira que seja cientificamente correta e transparente, e caso a caso. Segundo o protocolo, a falta de conhecimentos científicos ou de consenso científico não deve necessariamente ser interpretada como indicativo de um determinado nível de risco, uma ausência de risco ou um risco aceitável (ALEXANDROVA, GEORGIEVA & ATANASSOV, 2005).

Atualmente, o Protocolo de Cartagena conta com 143 países-partes (com 103 assinaturas), entre eles o Brasil, que se reúnem periodicamente (*Conference of the Parties – COP; Meeting of the Parties – MOP*) para discutir e decidir sobre medidas para minimizar a probabilidade de movimentos transfronteiriços não intencionais, reduzindo desta forma a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos sobre o ambiente que possam afetar a conservação e o uso sustentável da diversidade biológica (CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 2008).

A última reunião da Conferência das Partes do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança (COP8/ MOP3), foi realizada nos dias 13 a 17 de Março de 2006, em Curitiba, Brasil. De acordo com o programa de trabalho em médio prazo da COP-MOP, a reunião aprovou decisões como: requisitos detalhados para documentos que acompanham organismos vivos modificados destinados a serem utilizados diretamente na alimentação humana ou animal, ou para processamento; manipulação, transporte, embalagem e identificação; a necessidade de desenvolvimento de normas no que diz respeito à identificação, manipulação, embalagem e transporte para os movimentos transfronteiriços de OVM; avaliação de riscos e de gestão de risco; a necessidade de estabelecer órgãos subsidiários no âmbito do protocolo; outras questões necessárias para a implementação efetiva do Protocolo (direitos e/ou obrigações das partes de trânsito); monitorização e comunicação no âmbito do protocolo (CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 2008).

Internamente, a adesão do Brasil ao Protocolo reveste-se de grande importância em razão da sua condição de país megadiverso e, também, de exportador de alimentos. É a primeira vez que a comunidade internacional aprova

um acordo que impõe regras ao comércio de produtos transgênicos. Trata-se, portanto, de um instrumento de direito internacional que tem por objetivo proteger os direitos humanos fundamentais, tais como a saúde humana, a biodiversidade e o equilíbrio ecológico do meio ambiente, sem os quais ficam prejudicados os direitos à dignidade, à qualidade de vida, e à própria vida, direitos estes garantidos pela Constituição Federal de 1988 e consagrados pela Declaração Universal dos Direitos Humanos da Organização das Nações Unidas, de 1948 (CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA, 2006).

1.6.2. Abordagens Internacionais para a Rotulagem de Produtos GM

Internacionalmente, a Comissão do *Codex Alimentarius*, um órgão de padronização das normas internacionais para alimentos, tem um comitê sobre rotulagem de alimentos. Desde 1990, o *Codex* tem procurado desenvolver orientações para rotular alimentos oriundos da biotecnologia (CARTER & GRUERE, 2003).

Nos últimos anos, um número crescente de países adotou políticas de rotulagem de alimentos geneticamente modificados. As primeiras políticas de rotulagem foram introduzidas pela União Européia (UE) em 1997. Desde então, muitos outros países, incluindo todos os países desenvolvidos, têm adotado algum tipo de política para rotulagem dos alimentos geneticamente modificados. No entanto, estas políticas de rotulagem diferem muito em sua natureza, alcance, cobertura, exceções, e seu grau de execução. Conseqüentemente, os efeitos observados dessas políticas sobre a escolha dos consumidores, a informação para os consumidores, comércio dos alimentos, comércio internacional também variam significativamente (GRUERE & RAO, 2007).

Existe uma enorme lacuna entre as abordagens adotadas nos diferentes países para rotulagem dos alimentos geneticamente modificados. Por exemplo, a UE tem orientações muito rigorosas para a rotulagem de OGM. Por outro lado estão os Estados Unidos, a Argentina e o Canadá, cujos governos não acreditam na rotulagem obrigatória. Japão, Coréia do Sul, China e outros países estão em um meio termo entre a UE e os Estados Unidos sobre este tema. A razão apontada para o governo dos Estados Unidos não apoiarem a obrigatoriedade de rotulagem dos alimentos geneticamente modificados é que a *Food and Drug Administration* (FDA) considera que não há provas científicas de que alimentos geneticamente

modificados são nutricionalmente diferentes dos alimentos convencionais não-GM (CARTER, 2002).

As diretrizes para rotulagem voluntária ditam regras que definem quais alimentos podem ser chamados de GM e não-GM, e deixam as empresas de alimentos decidirem se querem utilizar essas informações em seus produtos. Em contrapartida, os países cuja rotulagem é obrigatória requerem que as empresas de alimentos (transformadores, retalhistas e, por vezes, os produtores) detalhem se o produto/ ingrediente alvo contém ou é obtido a partir de engenharia genética. Alguns países, com rotulagem obrigatória para ingredientes GM também têm diretrizes voluntárias para a rotulagem de alimentos não-GM (por exemplo, Japão e União Européia). Este sistema misto obrigatório/ facultativo está em vigor nos países com rotulagem obrigatória nos quais os consumidores estão dispostos a pagar um valor maior para evitar completamente ingredientes geneticamente modificados, mesmo que em nível residual (GRUERE & RAO, 2007).

Uma das grandes diferenças entre os regulamentos dos países que adotam a rotulagem obrigatória depende se o regulamento visa à presença de OGM no produto final (como a Austrália, Nova Zelândia e Japão) ou se visa a utilização da tecnologia do DNA recombinante como parte do processo de produção (como a UE, Brasil e China) (GRUERE & RAO, 2007).

O QUADRO 1 demonstra as abordagens internacionais de rotulagem de acordo com seu grau de estringência.

1.6.3. Rotulagem de Produtos GM na União Européia

A partir de meados dos anos noventa, principalmente, em decorrência das crises alimentares provocadas pelo surgimento da doença da “vaca louca” (Encefalopatia Espongiforme Bovina) e da contaminação inicial de frangos na Bélgica pela presença de dioxinas em rações, que se estendeu por toda a Europa, a segurança sanitária dos alimentos adquiriu destaque na segurança alimentar. Isso porque essas novas crises alteraram radicalmente a percepção dos consumidores sobre a qualidade dos alimentos e os tornaram mais exigentes sobre a ação do Estado para vigilância e controle da qualidade sanitária dos alimentos. Essa condição foi reforçada, pelo surgimento da gripe do frango (*Influenza aviária*), originária nos países asiáticos e que começou a se proliferar nos EUA e Norte da Europa, provocando crise de origem sanitária no setor (SILVA & AMARAL, 2004).

QUADRO 1: Características dos sistemas nacionais de rotulagem nos principais países de acordo com o grau de estringência de suas regulamentações.

País	Tipo de Rotulagem ^a	Produto/ Processo	Cobertura	Limites de detecção
União Européia	obrigatória e orientações para rotulagem voluntária ^h	processo	Alimentos, rações, aditivos, aromatizantes, produtos derivados de GM, restaurantes	0,9%
Brasil ^b	Obrigatória	processo	Alimentos, rações, produtos derivados de GM, carne e produtos animais	1%
China	Obrigatória	processo	Lista, produtos derivados de GM, restaurantes	0%
Austrália/ Nova Zelândia	Obrigatória e voluntária ^h	Produto	Todos os produtos baseados em conteúdo	1%
Japão	Obrigatória e voluntária ^h	Produto		5% ^f
Indonésia	Obrigatória	Produto		5% ^f
Rússia	Obrigatória	Produto	Todos os produtos baseados em conteúdo	0,9%
Arábia Saudita	Obrigatória	Produto		1%
Coréia do Sul	Obrigatória e voluntária ^h	Produto		3% ^g
Taiwan	Obrigatória e voluntária ^h	Produto		5%
Tailândia ^c	Voluntária	Produto		5% ^f
Argentina ^d	Voluntária	Produto	Não especificado - Todos os produtos baseados em conteúdo	-
África do Sul	Voluntária	Produto	Não especificado - Todos os produtos baseados em conteúdo	-
Filipinas ^e	Voluntária	Produto	Todos os produtos baseados em conteúdo	5%
Canadá	Voluntária	Produto	Todos os produtos baseados em conteúdo	5%
Estados Unidos		Produto	Todos os produtos baseados em conteúdo	-

a- somente para produtos substancialmente equivalentes; b- Regulamentação de rotulagem não foi totalmente implementada; c- Implementada com execução voluntária. São aplicadas penalidades em casos de fraude; d- Não há legislação específica; e- Regulamentação de rotulagem proposta; f- Nos três principais ingredientes de cada produto; g- Nos cinco ingredientes principais de cada produto; h – rotulagem voluntária para produtos não-GM. FONTE: GRUERE & RAO, 2007

Os produtos alimentares que contém OGM já estão disponíveis há algum tempo, embora muitos consumidores não tenham consciência disso. Porém, na Europa, os dois casos (doença da vaca louca e gripe do frango), puseram em questão a presença de organismos geneticamente modificados em alimentos, gerando uma forte oposição por parte dos consumidores, além do aumento da procura por maiores informações sobre este tipo de produto. Este acontecimento acabou se traduzindo na demanda por rotulagem dos produtos alimentares que contenham OGM (SCANDIZZO, 2002).

Por este motivo a União Européia fixou o mais rigoroso regime de importações de OGM em todo o mundo. Os pedidos de aprovação de OGM para liberação no ambiente ou colocação no mercado devem ser acompanhados por uma completa avaliação de risco identificando e avaliando os potenciais efeitos negativos do OGM, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, levando também em conta sua acumulação a longo prazo, efeitos sobre a saúde humana e o ambiente. Este procedimento foi reforçado no âmbito da revisão da Directiva 2001/18/CE, relativa à liberação de OGM no ambiente, que entrou em vigor em 17 de outubro de 2002. Em particular, a Directiva de 2001 introduz a obrigatoriedade de informar ao público, sobre notificações, avaliações e liberações de OGM, bem como normas gerais sobre rotulagem obrigatória e rastreabilidade em todas as etapas da colocação do mercado (BAUMÜLLER, 2003).

Desde abril de 2004, os produtos alimentares que consistem ou contêm OGMs e que sejam obtidos a partir de OGMs também estão sujeitos a exigências de rastreabilidade e rotulagem, conforme estabelecido no Regulamento (CE) 1830/2003 (MOSCHINI & LAPAN, 2005).

A legislação da UE estabelece um limite em porcentagem para o conteúdo do material GM (0,9%), acima do qual devem ser rotulados como alimentos que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM. Abaixo desse nível, não precisam informar no rótulo, desde que o conteúdo GM seja de construções que tenham sido autorizadas na União Européia para utilização e que se possa demonstrar que a presença é acidental e tecnicamente inevitável (ALEXANDROVA, GEORGIEVA & ATANASSOV, 2005).

Para os novos alimentos e rações o regulamento prevê que deve haver um limite de 0,5% para a presença acidental desde que o material tenha passado por uma boa avaliação de risco e que o operador possa demonstrar que a sua presença é tecnicamente inevitável. Este limiar, porém só pode ser aplicada quando é possível

testar a presença do material em questão. As diretivas 1829/03 e 1830/03 aumentam as atuais disposições relativas à rotulagem a todos os gêneros alimentícios e rações produzidos a partir de OGM, mesmo que sejam substancialmente equivalentes aos derivados de fontes não-OGM e, portanto, nenhum DNA exógeno ou proteína podem ser detectados no produto final (ALEXANDROVA, GEORGIEVA & ATANASSOV, 2005).

1.6.4. Rotulagem de Produtos GM nos Estados Unidos da América

Ao contrário de outras jurisdições, os Estados Unidos decidiram adaptar a legislação pré-existente para incluir os produtos originados da biotecnologia. Ao fazê-lo, estabeleceu um comitê global, o Escritório de Políticas de Ciência e Tecnologia (*Office of Science and Technology Policy – OSTP*) para estudar e distribuir responsabilidades entre as diversas agências reguladoras: a FDA, a *Environmental Protection Agency (EPA)* e o *United States Department of Agriculture (USDA)* (McHUGHEN & SMYTH, 2007).

O resultado foi uma publicação descrevendo vários pontos importantes. O mais importante, a OSTP concluiu que o DNA recombinante não era inerentemente arriscado e que a regulamentação deverá concentrar-se sobre os riscos dos produtos, e não os processos utilizados para desenvolvê-los; portanto, os produtos de DNA recombinantes não precisariam de nenhuma regulamentação nova ou especial. Em vez disso, a atual legislação e regulamentos concebidos para os produtos atuais poderiam ser adaptados para lidar com produtos da biotecnologia. A estrutura coordenada também reconheceu o conceito de que os OGM não eram intrinsecamente mais arriscados do que os não-GM (McHUGHEN & SMYTH, 2007).

O USDA, por intermédio do escritório de Serviços Reguladores de Biotecnologia (BRS), do *Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)*, está preocupado principalmente com a proteção da agricultura e do ambiente de potenciais pragas. O USDA regulamenta todas as plantas obtidas por engenharia genética antes da liberação ambiental, incluindo a importação, circulações interestaduais, testes de campo e, naturalmente, o cultivo comercial (fazenda) (McHUGHEN & SMYTH, 2007).

A FDA tem a responsabilidade de garantir a segurança dos alimentos humanos e o fornecimento de alimentos para animais. O Centro de Segurança Alimentar e Nutrição e do Centro de Medicina Veterinária avalia novos alimentos e

rações GM, focando sua atenção na composição da alimentação humana e animal, procurando a presença de alérgenos e toxinas novos ou alterados, e analisando as alterações nos níveis de nutrientes presentes normalmente, fibras e outros constituintes habituais. A FDA tem provavelmente a maior experiência em lidar com OGM, começando com o primeiro produto comercializado GM, a insulina humana (1982) e, posteriormente, o primeiro produto alimentar, a quimosina, para fazer queijo, em 1990 (2 anos após, o mesmo produto foi aprovado para lançamento comercial no Reino Unido). A FDA também tratou da primeira aprovação de um produto alimentar, o tomate FlavrSavr™, em 1994 (McHUGHEN & SMYTH, 2007).

A EPA é a autoridade responsável pelo desenvolvimento, comercialização, distribuição e avaliação de pesticidas, com especial preocupação às ameaças à saúde humana e ao ambiente, e define os limites residuais desses pesticidas em culturas de plantas (ALEXANDROVA, GEORGIEVA & ATANASSOV, 2005).

Nos Estados Unidos, alimentos que contenham ingredientes GM disponíveis atualmente no mercado americano, não necessitam ser rotulados, uma vez que o FDA determinou que esses alimentos são "substancialmente equivalentes" aos seus homólogos não-GM. Desta forma, os consumidores americanos vêm se alimentando de produtos que contém ingredientes GM (fubá, óleos, açúcares) nos últimos 10 anos, enquanto permanecem alheios à presença de OGM nestes produtos (FERNANDEZ-CORNEJO & CASWELL, 2006).

1.7. Legislação para OGM no Brasil

A Constituição Federal Brasileira de 1988 (BRASIL, 1988) em seu artigo 225 § 1º dispõe que "todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações", e para assegurar a efetividade desse direito, incumbe ao Poder Público, através dos incisos:

II - preservar a diversidade e a integridade do patrimônio genético do País e fiscalizar as entidades dedicadas à pesquisa e manipulação de material genético;

IV - exigir, na forma da lei, para instalação de obra ou atividade potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, estudo prévio de impacto ambiental, a que se dará publicidade;

V - controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente.

A Lei de Biossegurança nº 11.105 de 24 de março de 2005 (BRASIL, 2005) revoga a lei nº 8.974 de 5 janeiro de 1995 (BRASIL, 1995) e estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e descarte de OGM e seus derivados, tendo como diretrizes o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, e a observância do princípio da precaução para proteção do meio ambiente. Além disso, ela cria o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), órgão de assessoramento superior do Presidente da República para formulação e implementação da Política Nacional de Biossegurança (PNB) (BRASIL, 2005).

A liberação de OGM vem sendo condicionada à observância dessa Lei, que exige além do conhecimento científico acerca das características, riscos e propriedades de tais produtos, a observância de todo o procedimento previsto e avaliação prévia da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, isto é, a realização do Estudo Prévio do Impacto Ambiental (EPIA) e apresentação de Relatório do Impacto no Meio Ambiente (RIMA) visando desta maneira regulamentar o disposto no artigo 225 § 1º da Constituição Federal Brasileira. Com a ratificação pelo Brasil da Convenção da Biodiversidade, a observância do princípio da precaução deve ser plena, pois não haveria outro caminho na ausência de segurança em relação ao meio ambiente senão ser cauteloso (ANEZ, 2005).

A Resolução nº 17 de 30 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA – estabelece as diretrizes básicas para a avaliação do risco e segurança dos alimentos, para o controle sanitário dos alimentos, visando proteger a saúde da população (BRASIL, 1999).

1.7.1. A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio

A CTNBio, órgão criado pela Medida Provisória nº 2.191-9 de 23 de agosto de 2001 e reestruturado pela nova Lei de Biossegurança, tem por função prestar apoio técnico consultivo e de assessoramento ao Governo Federal na formulação,

atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança (PNB), bem como estabelecer normas técnicas de segurança e de pareceres técnicos referentes à autorização para atividades que envolvam pesquisa e uso comercial de OGM e seus derivados, como base na avaliação de seu risco zoofitossanitário, à saúde humana e ao meio ambiente (BRASIL, 2001).

O Decreto nº 5.591 de 22 de novembro de 2005 dispõe em seu artigo 4º, parágrafo único que: “A CTNBio deverá acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico e científico nas áreas de biossegurança, biotecnologia, bioética e afins, com o objetivo de aumentar sua capacitação para a proteção da saúde humana, dos animais e das plantas e do meio ambiente.”, além de dispor através de seus incisos sobre a composição e as competências da CTNBio, entre elas (BRASIL, 2005):

III - estabelecer, no âmbito de suas competências, critérios de avaliação e monitoramento de risco de OGM e seus derivados

IV - proceder à análise da avaliação de risco, caso a caso, relativamente a atividades e projetos que envolvam OGM e seus derivados;

VI - estabelecer requisitos relativos a biossegurança para autorização de funcionamento de laboratório, instituição ou empresa que desenvolverá atividades relacionadas a OGM e seus derivados;

VIII - autorizar, cadastrar e acompanhar as atividades de pesquisa com OGM e seus derivados, nos termos da legislação em vigor;

IX - autorizar a importação de OGM e seus derivados para atividade de pesquisa;

X - prestar apoio técnico consultivo e de assessoramento ao Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS na formulação da Política Nacional de Biossegurança de OGM e seus derivados;

XI - emitir Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB para o desenvolvimento de atividades com OGM e seus derivados em laboratório, instituição ou empresa e enviar cópia do processo aos órgãos de registro e fiscalização;

XII - emitir decisão técnica, caso a caso, sobre a biossegurança de OGM e seus derivados, no âmbito das atividades de pesquisa e de uso comercial de OGM e seus derivados, inclusive a classificação quanto ao grau de risco e nível de biossegurança exigido, bem como medidas de segurança exigidas e restrições ao uso;

XIV - classificar os OGM segundo a classe de risco, observados os critérios estabelecidos neste Decreto;

XVIII - apoiar tecnicamente os órgãos e entidades de registro e fiscalização, no exercício de suas atividades relacionadas a OGM e seus derivados;

1.7.2. Aprovações comerciais no Brasil

Em agosto de 2007, a CTNBio aprovou a liberação comercial do milho transgênico resistente a insetos da ordem Lepidóptera (milho Guardian, evento MON810), desenvolvido pela empresa norte-americana Monsanto. O transgênico é o segundo milho a ser liberado para comercialização pela CTNBio desde a aprovação da nova lei de Biossegurança. Em maio, a comissão havia aprovado o Libert Link (T25), da empresa alemã Bayer e tolerante ao herbicida glufosinato de amônio. (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA 2007a; COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA 2007b; MATTEDI, 2007)

No entanto, dois importantes órgãos de fiscalização ligados ao governo federal - a ANVISA e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) - apresentaram recursos ao Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) pedindo a anulação da decisão da CTNBio quanto a liberação do milho Liberty Link. Os recursos apresentados pelo IBAMA e pela ANVISA estão em acordo com a Lei de Biossegurança, que determina que as decisões da Comissão podem ser revogadas pelo CNBS, que é um colegiado composto por onze ministérios (Casa Civil, Ciência e Tecnologia, Saúde, Meio Ambiente, Desenvolvimento Agrário, Agricultura, Justiça, Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Relações Exteriores, Defesa e Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca).

No documento ao CNBS, o IBAMA evoca "a possibilidade de que a deliberação tomada pela CTNBio traga graves impactos para a saúde pública e, em especial, para o meio ambiente" e enumera as razões para isso: "Inexistência de estudo prévio de impacto ambiental realizado nas condições edafoclimáticas do país; ausência de avaliação de risco, caso a caso, que fundamente a decisão da Comissão; ausência de Instrução Normativa específica com diretrizes para analisar a avaliação de risco; ausência de plano e procedimentos de coexistência do cultivo de milho geneticamente modificado sem contaminação de outros tipos de milho e irregularidades processuais" (THUSWOHL, 2007). Em seu recurso, a ANVISA,

ligada ao Ministério da Saúde, declara que “o processo de liberação comercial do milho Liberty Link possui estudos inadequados e insuficientes para atestar a segurança alimentar e determinar os riscos à saúde pública da cultura geneticamente modificada”. Entre as irregularidades apontadas pela agência estão a falta de estudos toxicológicos ou de alergenicidade. Na opinião da ANVISA, a Bayer deve apresentar estudos sobre as conseqüências do consumo do produto transgênico para a saúde humana e, em especial para a amamentação (GREENPEACE, 2007).

Os recursos do IBAMA e da ANVISA devem ser analisados assim que a secretaria-executiva do colegiado, vinculada à Casa Civil, convocar uma reunião para avaliar a decisão da CTNBio (GREENPEACE, 2007).

A juíza federal Pepita Durski Tramontini Mazini, da Vara Ambiental de Curitiba, determinou que a Comissão suspenda novamente as deliberações sobre as liberações comerciais de milho transgênico. Segundo a decisão da juíza, as normas recém elaboradas pela Comissão não atendem ao princípio da precaução e à Lei de Biossegurança e, portanto, deverão ser revistas. Com isso, as autorizações já concedidas para os milhos Liberty Link da Bayer e MON810 da Monsanto estão suspensas (GREENPEACE, 2007).

Elaborar normas de coexistência e de monitoramento pós-liberação comercial de milhos transgênicos é requisito legal, e agora também judicial, para concretizar as autorizações já concedidas pela CTNBio e também para futuras autorizações. Por desobedecer a legislação, a CTNBio foi obrigada, em julho deste ano, por meio de decisão liminar, a estabelecer – previamente a qualquer liberação de milho transgênico – medidas de biossegurança para garantir a coexistência das variedades de milho orgânicas, convencionais ou agroecológicas com as variedades transgênicas. Também foi exigida a elaboração do plano de monitoramento aplicável após a introdução da espécie transgênica no meio ambiente (GREENPEACE, 2007).

Até o presente momento, estão liberados para comercialização a soja Roundup Ready (evento GTS 40-3-2) e o algodão Bollgard (Bt), evento 531, ambos produzidos pela Monsanto (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA, 1998; COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA, 2005).

1.7.3. Rotulagem de Produtos que contém OGM no Brasil

A Lei nº 8.078 de 11 de setembro de 1990, também conhecida como Código de Defesa do Consumidor (CDC), tem por objetivo o atendimento das necessidades do consumidor (toda pessoa física ou jurídica que adquire ou utiliza produto ou serviço como destinatário final), o respeito à sua dignidade, saúde e segurança, a proteção de seus interesses econômicos, a melhoria da sua qualidade de vida, bem como a transparência e harmonia das relações de consumo (BRASIL, 1990).

Em seu artigo 6º, o CDC dispõe os direitos básicos do consumidor, entre eles:

I - a proteção da vida, saúde e segurança contra os riscos provocados por práticas no fornecimento de produtos e serviços considerados perigosos ou nocivos;

III - a informação adequada e clara sobre os diferentes produtos e serviços, com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade e preço, bem como sobre os riscos que apresentem;

Em abril de 2003, o governo brasileiro emitiu o Decreto nº 4.680 (BRASIL, 2003) regulamentando o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078/90 (BRASIL, 1990), quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados.

O artigo 2º deste decreto dispõe sobre a obrigatoriedade de rotulagem informando ao consumidor sobre a presença de organismo geneticamente modificado, caso sua presença seja detectada acima do limite estabelecido por lei (1%), tanto em produtos embalados quanto os vendidos à granel ou *in natura*, devendo constar em destaque no rótulo uma das seguintes expressões, dependendo do caso: "(nome do produto) transgênico", "contém (nome do ingrediente ou ingredientes) transgênico(s)" ou "produto produzido a partir de (nome do produto) transgênico", assim como o nome da espécie doadora do gene. Essas informações também deverão constar no documento fiscal, de modo que estes acompanhem o produto ou ingrediente em todas as etapas da cadeia produtiva (BRASIL, 2003).

Os alimentos e ingredientes produzidos a partir de animais alimentados com ração contendo ingredientes transgênicos deverão trazer no painel principal, em tamanho e destaque previstos no art. 2º, a seguinte expressão: "(nome do animal) alimentado com ração contendo ingrediente transgênico" ou "(nome do ingrediente) produzido a partir de animal alimentado com ração contendo ingrediente transgênico" (BRASIL, 2003).

Aos alimentos e ingredientes alimentares que não contenham nem sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados será facultada a rotulagem "(nome do produto ou ingrediente) livre de transgênicos", desde que tenham similares transgênicos no mercado brasileiro (BRASIL, 2003).

Em complementação ao Decreto nº 4.680/03 (BRASIL, 2003), a Portaria nº 2.658 de 22 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003), define a forma e as dimensões mínimas do símbolo que comporá a rotulagem tanto dos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal embalados como nos vendidos a granel ou in natura, que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados (BRASIL, 2003).

Em 2007 a ANVISA abriu a consulta pública nº 63 para definir padrões para procedimentos de avaliação de segurança deste tipo de alimento pela Comissão Técnica Nacional da Política Nacional de Biossegurança relativa a OGM. A partir desta iniciativa da ANVISA, uma série de normas deverá ser cumprida na avaliação da segurança de alimentos que contenham OGM e seus derivados. A Consulta Pública 63 propôs 119 questões que visam avaliar se os dados apresentados pelos interessados em obter liberação comercial de produtos com OGM comprovam ou não a segurança de uso para o consumo humano. Essas questões estão divididas em quatro áreas de análise: modificação genética, organismos receptores, segurança alimentar e qualidade nutricional. Os critérios técnicos previstos na consulta pública subsidiarão a atuação da ANVISA na Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS) do Ministério da Saúde. A CBS, a pedido da CTNBio, avalia os processos relativos aos pedidos de liberação comercial de alimentos geneticamente modificados, incluindo os transgênicos. De acordo com a Lei de Biossegurança nº 11.105/05 (BRASIL, 2005), a liberação comercial de OGM e derivados é competência da CTNBio, respeitadas as competências legais de fiscalização e regulamentação de outras instituições federais. Por isso, no caso dos transgênicos, o processo de liberação comercial passa por análise da CBS, da qual a ANVISA é membro permanente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007).

Apesar de ser um assunto de alta repercussão em todo o mundo, a informação aos consumidores, principais interessados no assunto, parece ser mínima. Uma pesquisa de opinião pública OPP573/2002 realizada pelo Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (IBOPE) revela que os transgênicos não têm boa aceitação no Brasil. 65% dos pesquisados afirmam que os transgênicos deveriam ser proibidos. Além disso, o direito de não ingerir transgênicos deve ser

garantido, acreditam os brasileiros. Uma outra informação é que a grande maioria, 92% dos entrevistados, diz que produtos com ingredientes transgênicos devem trazer esta informação no rótulo. A pesquisa também indica que a maioria da população brasileira nem sabe o que são transgênicos: 61% dos entrevistados nunca ouviram falar neles. Depois da explicação apresentada pelo entrevistador, 71% dos entrevistados disseram que se pudessem escolher entre um alimento modificado geneticamente e outro não modificado, comeriam um alimento que não fosse transgênico. O estudo foi realizado a pedido do Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC) (INSTITUTO BRASILEIRO DE OPINIÃO PÚBLICA E ESTATÍSTICA, 2003).

1.8. Detecção de OGMs em alimentos

O cumprimento da legislação que regulamenta a comercialização de alimentos e ingredientes contendo OGMs é totalmente dependente da sensibilidade e confiabilidade dos métodos de detecção e quantificação de OGMs (CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006).

OGMs geralmente são caracterizados pela presença de um ou mais segmentos de DNA exógenos, que podem ou não proporcionar a expressão de novas proteínas. Sendo assim, a detecção destes organismos é focalizada na seqüência de DNA exógena (métodos baseados em PCR) ou na proteína transgênica (imunoensaios, ELISA, *Western Blot*). A análise de rotina de produtos alimentícios contendo OGMs compreende três etapas: detecção; identificação do OGM presente na amostra, para determinar se este é autorizado e; quantificação do OGM no produto, para checar a necessidade de rotulagem ou não, conforme a legislação (SHEHATA, 2005; CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006).

A detecção de OGMs, através da proteína expressa, nem sempre é possível. Isto ocorre quando o nível de expressão da proteína transgênica nas partes das plantas que são utilizadas na produção de alimentos é muito baixo. A concentração de proteína transgênica nos tecidos de plantas varia em função da idade, variedade e condições ambientais. Outra situação desfavorável é o processamento do alimento, que pode promover a remoção das proteínas em determinados produtos, como em xaropes e óleos altamente refinados, ou a desnaturação das mesmas, alterando a sua conformação e impedindo o seu reconhecimento pelo anticorpo. Outra limitação é a incapacidade de detectar alimentos contendo OGMs cuja

modificação genética resulta no aumento da expressão de uma proteína nativa (MIRAGLIA et al., 2004).

O DNA, por ser mais estável que a maioria das proteínas, é passível de ser detectado em alimentos processados. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que consiste na amplificação seletiva de seqüências específicas da molécula de DNA, é o principal método utilizado na detecção e quantificação de alimentos contendo OGMs. É um método sensível, específico, seguro, capaz de detectar uma ampla série de eventos e de distinguir as variedades GM que apresentam diferentes construções gênicas, porém expressam a mesma proteína. Além disso, a PCR também é capaz de detectar OGMs que utilizam a tecnologia anti-sense (HOLST-JENSEN et al., 2003; CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006).

Métodos baseados em PCR para o monitoramento de cultivos de OGM e para detecção qualitativa e quantitativa de soja e milho geneticamente modificados são amplamente utilizados em análises de rotina para verificar se um determinado produto alimentício contém material derivado de culturas geneticamente modificadas (CARDARELLI et al., 2005). Estes métodos são baseados na estabilidade das cadeias de ácido nucléico que resistem aos tratamentos envolvidos na produção de alimentos (FORTE et al., 2005).

Embora a tecnologia da PCR tenha suas limitações, o alto grau de especificidade e sensibilidade explica porque esta tem sido a primeira escolha da maioria dos laboratórios de análises interessados na detecção de OGM e derivados. Uma vez que a maioria dos produtos que esses laboratórios recebem são processados e refinados, a qualidade e a quantidade do alvo a ser analisado (proteína ou DNA) freqüentemente desafiam a sensibilidade de qualquer método de detecção (HOLST-JENSEN et al., 2003).

Testes de detecção de OGM podem ser limitados a uma simples PCR. No entanto, a identificação específica do OGM do qual o DNA é retirado, ou a quantificação segura do DNA extraído de OGM onera consideravelmente o custo do método, em particular se o número de OGMs a ser testado aumentar. O desenvolvimento de testes com maior eficiência e menor custo e a utilização de técnicas multiplex têm recebido bastante atenção recentemente (HOLST-JENSEN et al., 2003).

A detecção qualitativa de OGM já foi descrita em vários países como na Noruega (HEIDE et al., 2007), na Irlanda (FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND, 2001), na Alemanha (TENDEL et al., 2001), no Egito (SANHOTY et al.,

2002), em Taiwan (CHIUEH et al, 2002), no México (ORTIZ-GARCÍA et al., 2005), no Japão, entre outros (YAMAGUCHI et al., 2003).

No Brasil, a detecção de OGM (semente de soja Roundup Ready e milho Bt176 e MON810) em produtos alimentícios já foi realizada por Cardarelli et al. (2005). De um total 89 amostras, incluindo semente de soja bruta, sopas desidratadas, leite de soja em pó, temperos, biscoitos, ração animal entre outros, 22 foram positivas para o promotor 35S, e destas, 16 amostras foram positivas para a presença de soja RR. Na pesquisa pelos milhos MON810 e Bt176, nenhuma amostra foi positiva.

Ainda no Brasil, Greiner & Konietzny (2008) relatam que a presença de soja geneticamente modificada em produtos alimentares aumentou progressivamente de 13% em 2000 para 78% em 2005, enquanto que independente do ano, cerca de 10% dos alimentos contendo milho demonstraram produtos constituídos por materiais derivados de milho geneticamente modificado. Em média, 8% dos produtos alimentares contendo milho neste estudo, recolhidos a partir de 2001, foi identificado como positivos para a presença de material derivado dos milhos transgênicos eventos Bt176 (Maximizer™), Bt11, MON810 (YieldGard™) ou T25 (LibertyLink™).

1.8.1. A multiplex PCR - mPCR

A multiplex PCR é uma variante da PCR na qual mais de uma seqüência alvo de DNA são amplificadas simultaneamente na mesma reação pela inclusão de mais de um par de iniciadores. A Multiplex PCR reduz consideravelmente o tempo e esforço dentro do laboratório, sem comprometimento dos resultados. Desde a sua primeira descrição em 1988, este método tem sido aplicado com sucesso em muitas áreas de análises de DNA, incluindo análises de deleções, mutações e polimorfismos ou ensaios quantitativos e detecção de RNA (RT-PCR). Na área de doenças infecciosas, a técnica tem se mostrado um importante para a identificação de vírus, bactérias, fungos e/ ou parasitas (HENEGARIU et al. 1997; ELNIFRO et al, 2000).

A disponibilidade na literatura de seqüências de DNA de alguns transgênicos de interesse e as facilidades no seqüenciamento de genes ampliaram a possibilidade do desenvolvimento de novos métodos de PCR específicos. A disponibilidade de novas Taq polimerases permitiu o desenvolvimento de novos

protocolos para PCR, entre eles a multiplex PCR (mPCR), na qual ocorre a combinação de vários pares de *primers* (ou iniciadores) em um único tubo de reação, que resulta em um grande número de informações em um tempo mais curto que a PCR simples e com menor consumo de reagentes (GERMINI et al., 2004; FORTE et al., 2005).

Vários estudos recentes têm descrito o uso da multiplex PCR como um monitoramento rápido e conveniente para a detecção de OGM (JAMES et al., 2003).

Hurst, Knight & Bruce (1999) pesquisaram a presença de soja RR e de milho Bt176 em uma variedade de produtos processados incluindo amostras de farinha de soja, proteína isolada de soja, soja extrudada e desengordurada, precipitados de soja concentrados, lecitina de soja, sêmola de milho, temperos de milho e salgados de milho. Para a detecção da soja transgênica foram utilizados um par de iniciadores para a região correspondente ao 35S, um par para a região entre o 35S e o gene EPSPS, e um par para a detecção do gene da lectina de soja. Para a detecção do milho, foram utilizados dois pares de iniciadores, um correspondente ao gene da invertase do milho e outro correspondente ao gene da δ -endotoxina do *B. thuringiensis*. Os iniciadores foram utilizados tanto em reações de PCR simples como em mPCR (de soja e milho separadamente). Os autores encontraram transgênicos nas amostras de soja extrudada e desengordurada e em precipitados de soja concentrados.

Tao et al. (2001) desenvolveram uma mPCR, na qual utilizaram sete pares de iniciadores para a detecção de seqüências correspondentes ao promotor 35S, ao terminador *nos*, ao marcador de seleção (neomicina fosfotransferase-II), ao gene repórter (β -glucuronidase), o gene funcional (EPSPS) e ao inibidor de tripsina do feijão-caupi (feijão fradinho), na busca por seqüências exógenas em soja e tabaco. O autor afirma que o método é altamente sensível e eficiente, pois apesar de existir a possibilidade de contaminação por vírus e bactérias, a detecção de alvos como o gene repórter ou mesmo o marcador de seleção, garante que as plantas sejam GM.

Matsuoka et al. (2001) aprimoraram uma técnica de PCR multiplex para a detecção de cinco linhagens de milho geneticamente modificado, utilizando seis pares de iniciadores, um par para detecção da zeína do milho e os outros pares para a detecção específica dos milhos MON810, Bt11, Evento 176, T25 e GA21. No entanto o autor relata que este método só pode ser utilizado para os grãos de milho, pois os amplicons encontrados são muito grandes para serem detectados em alimentos que tenham sido processados ou cozidos.

James et al. (2003) desenvolveram um procedimento multiplex para a detecção simultânea de seqüências alvo de soja RR, quatro linhagens de milho (Bt176, Bt11, MON810 e T14/25) e quatro linhagens de canola (GT73, HCN92/28, MS8/RF3 e Oxy 235). Para a detecção de soja RR foram utilizados cinco pares de iniciadores que tinham como alvos o gene *epsps*, o promotor 35S, o terminador *nos*, o gene da lectina e o gene da β -actina. Estes iniciadores foram combinados com sucesso na mPCR para amplificar simultaneamente todos os cinco alvos, bem como de distinguir confiavelmente a soja não-GM da soja Roundup Ready. Para a detecção das linhagens de milhos foram utilizados quatro pares de iniciadores e mais um par para o gene da zeína do milho. Todas as reações apresentaram os produtos esperados, exceto um relativo ao fragmento de 485 pb associado ao milho Bt176. A análise dos iniciadores em relação à seqüência do milho evento 176 em um programa de análise de seqüências revelou as razões para presença do produto esperado de 152 pb, bem como para o inesperado produto de 485 pb. Os primeiros 10, de 19 de nucleotídeos na terminação 3' do iniciador antisense alinhavam perfeitamente com a seqüência de 467 nucleotídeos da região *downstream* do sítio de ligação do iniciador sense do evento 176, resultando em um segundo produto de PCR de 485 pb. Estudos anteriores demonstraram que, sob as condições adequadas, é possível a amplificação de iniciadores que são 63-83% complementares, com 5-10 bases que complementam perfeitamente no 3' final dos iniciadores.

Germini et al. (2004) propuseram um método para a detecção simultânea de quatro linhagens transgênicas de milho (MON810, Bt11, Bt176 e GA21) e da soja RR. As seqüências alvo foram amplificadas utilizando sete pares de iniciadores (6 que foram utilizados para a padronização desta dissertação e o correspondente ao milho GA21). Foram utilizados controles cruzados e negativos para garantir a especificidade de cada primer. O comprimento do amplicon parece ser um fator crucial para a detecção de DNA em alimentos processados já que a degradação do DNA durante o processamento pode frequentemente conduzir a falsos resultados negativos devido à presença de DNA altamente fragmentado. Por esta razão, a multiplex PCR foi fixada com amplicons de comprimento não superior a 270 pb para detectar com êxito a presença de OGM mesmo em alimentos altamente processados. A mPCR desenvolvida por Germini et al. (2004) passou por uma validação completa, sendo realizada em quatro laboratórios independentes na

Europa, tendo como parâmetros o limite de detecção (LOD), especificidade, repetibilidade, reprodutibilidade e desvios positivos e negativos.

Onishi et al. (2005) desenvolveram uma metodologia de mPCR para a detecção simultânea de oito eventos de milho geneticamente modificados (Bt11, Event176, GA21, MON810, MON863, NK603, T25, and TC1507). Segundo o autor, o método foi capaz de detectar especificamente a presença dos oito eventos com alta sensibilidade. Porém, destaca que a sensibilidade da detecção pode ser afetada quando a concentração de um evento é maior que a dos outros, porque a amplificação de um gene em maior abundância pode interferir na amplificação de outro alvo que esteja em menor concentração.

Hernández et al. (2005) descreveram um método de mPCR para detecção simultânea de quatro linhagens de milho geneticamente modificadas (Bt11, MON810, T25, and GA21). Um iniciador complementar ao promotor 35S foi utilizado para amplificar a seqüência das linhagens de milho MON810, Bt11, e T25. Os milhos Bt11 e T25, também dividem os iniciadores correspondentes à região do gene *pat*. Porém a presença de um gene enhancer (*Adh1*) faz com que o amplicon correspondente a ao milho Bt11 apresente um maior tamanho. Para detectar a presença do milho GA21, foi utilizado um par de iniciadores específicos que tinham como alvo a região 5' do vetor utilizado para transformação (pDPG434) e o promotor da actina do arroz (*act-r*). O ensaio permitiu a amplificação do evento MON810 produzindo um amplicon 468 pb correspondente a seqüência que vai do promotor 35S ao íntron hsp. A amplificação dos eventos Bt11 e T25 rendeu dois amplicons de 280 e 177 pb, respectivamente, correspondentes a seqüência que vai do promotor 35S ao gene PAT enquanto a amplificação da região 5' de flaqueamento do GA21 deu origem a um amplicon de 72 bp. A mPCR foi testada em diferentes laboratórios. Para avaliar a transferência do ensaio como um primeiro passo em direção a um pleno julgamento interlaboratorial, necessário para validação do ensaio. O método foi realizado igualmente tanto no laboratório receptor como no que desenvolveu a técnica, mostrando sensibilidades idênticas, apresentando-se robusto, fácil, altamente sensível e rápido.

Liu et al. (2005) realizaram a detecção de soja RR utilizando para isso dois pares de iniciadores (duplex PCR), que co-amplificam as seqüências do gene para lectina de soja e a seqüência que corresponde ao intervalo do gene do peptídeo de trânsito da petúnia (CTP) até a terminação no 5' do gene EPSPS dentro da mesma reação.

Forte et al. (2005) desenvolveram uma técnica de mPCR para detecção de três linhagens de milho transgênico (MON810, Bt176 e Bt11) e uma linhagem de soja tolerante a herbicida (Roundup Ready) utilizando somente quatro pares de iniciadores (para detecção dos genes da zeína, da lectina, o promotor 35S e o terminador NOS), realizando a multiplex para cada tipo de evento separadamente.

Heide et al. (2007) apresentaram um ensaio para detecção simultânea de oito eventos de milho geneticamente modificados (T25, GA21, TC1507, MON863, MON810, NK603, BT176, BT11), utilizando-se para isso nove pares de iniciadores (oito para os eventos específicos e um para a detecção do gene endógeno do milho *hmgA*). A PCR foi realizada com iniciadores marcados com grupos fluorescentes e os amplicons foram visualizados utilizando eletroforese capilar com fluorescência. Quinze amostras de alimentos e rações (grãos de milho, ração de galinha, cachorro, mistura para massas, alimentos a base de milho, pipoca entre outros) foram analisadas pelo método sendo, porém em quatro amostras não foi detectado a presença de milho. Nas outras onze foi detectado em cada alimento pelo menos um dos tipos de milho analisados.

2. OBJETIVO GERAL

O contínuo aumento do número de variedades de culturas transgênicas sendo testadas em campo ou permitidas necessita de métodos robustos para a detecção de múltiplos OGM de uma só vez, fazendo da mPCR um método útil no monitoramento de transgênicos na matéria prima e em alimentos processados (KUIPER et al., 2004; ONISHI et al., 2005).

Uma vez que os riscos produzidos pelos transgênicos ainda são pouco conhecidos, são necessárias medidas de prevenção e monitoramento de produtos contendo OGM ou derivados. O presente trabalho tem como objetivo a utilização da técnica de PCR multiplex para a detecção de vários transgênicos em produtos alimentícios, visando o monitoramento destes, com a diminuição o tempo de diagnóstico e utilizando uma menor quantidade de reagentes.

2.1. Objetivos Específicos

- Padronizar a técnica de multiplex PCR para a detecção simultânea da presença de três espécies transgênicas de milho - MON810, Bt176 e Bt11 (resistentes a insetos) e uma de soja - Roundup Ready (tolerante a herbicida), como descrito no trabalho de Germini et al. (2004).
- Reavaliar 40 amostras obtidas na análise do INCQS por PCR simples utilizando a técnica multiplex e provar sua eficiência

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de Alimentos

Os produtos analisados quanto à presença de OGM foram processados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ) e enviados em forma de pó, identificados conforme a primeira análise realizada em triplicata através de PCR simples por este setor em busca de milho e soja geneticamente modificados. Foram utilizadas 40 amostras de produtos pertencentes às seguintes categorias: produtos cárneos, proteína texturizada de soja, grãos, leite de soja, pó para preparo de bebidas, massas alimentícias, ração para animais, farinhas, pós para preparos de alimentos (exceto os pós à base de chocolate), sopas desidratadas ou submetidas a tratamento térmico, alimentos à base de proteína vegetal (congelados ou não) e fubá. Os produtos foram analisados por ensaio cego já que a única identificação dos produtos era o número de realização da primeira análise.

3.2. Materiais de Referência

Os materiais de referência que foram utilizados estão descritos abaixo e são produzidos pelo *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) e comercializados por Fluka Chemie GmbH:

- ERM – BF410: conjunto composto de soja na forma de pó seco contendo a concentração de 1% de soja Roundup Ready[®] (soja RR).
- ERM – BF411: conjunto composto de milho na forma de pó seco contendo a concentração de 1% de milho Bt176.
- ERM – BF412: conjunto composto de milho na forma de pó seco contendo a concentração de 1% de milho Bt11.
- ERM – BF413: conjunto composto de milho na forma de pó seco contendo a concentração de 1% de milho Mon810.

3.3. Extração de DNA

A extração de DNA dos alimentos e dos materiais de referência foi feita através de duas metodologias: uma utilizando o brometo de cetiltrimetilamônio (método CTAB) e a outra utilizando o DNeasy[®] Mini kit produzido pela QIAGEN .

Antes da extração aproximadamente 100 mg dos alimentos e dos materiais de referência foram pesados em balança analítica de quatro dígitos (Mettler HK-160) localizada no setor de meios de cultura do Departamento de Microbiologia do INCQS.

3.3.1. Pesagem do Material

Antes da pesagem das amostras a balança foi preparada da seguinte forma:

- o prato da balança foi forrado com papel alumínio para evitar que houvesse contaminação do mesmo e conseqüentemente uma contaminação cruzada.
- um microtubo de 1,5 mL foi colocado sobre o papel alumínio e a balança foi tarada (zerada).

Com uma espátula previamente limpa com solução de álcool a 70%, o material foi retirado dos frascos identificados e colocados dentro do microtubo de 1,5 mL e este repousado sobre o prato da balança para verificação do peso do material. Este procedimento foi realizado tanto para a extração com o método CTAB como para a extração com o DNeasy[®] Kit, da Qiagen.

3.3.2. Método CTAB

A extração de DNA pelo método CTAB foi realizada conforme o Procedimento Operacional Padronizado (POP) número 65.3230.009 (MANUAL DA QUALIDADE, 2006) do INCQS.

Para a realização da extração do DNA do material analisado pelo método CTAB, foi adicionado 1 mL de tampão CTAB em aproximadamente 100 mg do material analisado em microtubo de 1,5 mL. Os tubos foram vedados com filme plástico e a mistura homogeneizada em agitador de tubos (Daigger Vortex Genie 2), sendo depois incubada em banho termostático seco a $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (*Type 17600 Dri-Bath* Barnstead/Thermolyne) por aproximadamente 1h30 min, sendo homogeneizada a cada 15 min em agitador de tubos.

O material foi então centrifugado por 10 min a 13000 rpm (*Centrifuge 5415D* Eppendorf). Do sobrenadante, 500 μ L foram transferidos para outro microtubo de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 200 μ L de clorofórmio em capela com exaustão, homogeneizados em agitador de tubos por aproximadamente 30 segundos e centrifugado a 13000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi então transferido para outro microtubo de 1,5mL, adicionando-se 2 vezes seu volume de tampão de precipitação com CTAB, homogeneizando-se por inversão. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por aproximadamente 1 h 30 min e em seguida centrifugada a 14000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado.

O precipitado foi dissolvido em 350 μ L de NaCl 1,2 M, adicionados de 350 μ L de clorofórmio (em capela com exaustão), homogeneizado em agitador de tubos por 30 segundos e centrifugado a 13000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL, adicionado de igual volume de álcool isopropílico gelado e homogeneizado por inversão. O material foi então armazenado em freezer a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período *overnight*.

O material foi homogeneizado por inversão e centrifugado a 13000 rpm por 10 min a 4°C em centrífuga refrigerada. O líquido foi desprezado e o material foi completamente seco invertendo-se o tubo com a tampa aberta sobre papel absorvente, na bancada, e à temperatura ambiente por aproximadamente 2 h.

O sedimento foi ressuspenso em 50 a 100 μ L de água purificada estéril e transferido para microtubo de 0,5 mL. A solução de DNA foi mantida sob refrigeração em freezer a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.3.3. DNeasy[®] Mini Kit da Qiagen

O protocolo de extração de DNA pelo kit foi feito seguindo as orientações do manual de instruções do produto com algumas poucas alterações.

Aos 100 mg de alimentos previamente pesados, foram adicionados 400 μ L do tampão de lise AP1 homogeneizados em agitador de tubos (Daigger Vortex Genie 2), adicionados de 4 μ L de RNase A a 100 mg/ mL, e agitados vigorosamente em agitador de tubos para evitar a formação de aglomerados.

A mistura foi incubada por 15 min a $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em banho termostático seco (Type 17600 Dri-Bath Barnstead/Thermolyne), homogeneizando-se os tubos por inversão a cada 5 min, adicionado de 130 μ L do tampão de precipitação AP2 e homogeneizado em agitador de tubos. Essa mistura foi incubada por 10 min em

banho de gelo. Após esse período o material foi centrifugado a 13000 rpm por 5 min e o sobrenadante transferido para a coluna Qiashredder Minispin (de coloração lilás) que foi acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugado a 13000 por 2 min.

A fração que atravessou a coluna e ficou retida no tubo coletor foi transferida para um microtubo de 1,5 mL tendo o cuidado para não coletar o precipitado celular. Ao material colhido foram adicionados 1,5 X o seu volume de tampão AP3/E para limpar o lisado. Dessa mistura foram transferidos 650 µL para a coluna DNeasy Minispin (de coloração branca) acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugados por 1 min a 8000 rpm. O material que atravessou a coluna foi descartado e a operação foi repetida com o restante da mistura que ficou no microtubo de 1,5 mL. Ao final da repetição descarta-se também o tubo coletor ficando somente com a coluna DNeasy Minispin.

A coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL e a ela foram adicionados 500 µL de tampão AW. O material foi centrifugado por 1 min a 8000 rpm. O material do tubo coletor foi descartado e esta operação foi repetida reutilizando-se o tubo coletor. Foram adicionados mais 500 µL de tampão AW e centrifugou-se a 13000 rpm para secar a membrana. Ao final desta operação o tubo coletor foi descartado.

A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL. Foram colocados diretamente sobre a membrana da coluna 50 µL do tampão de eluição AE, e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Após esse período foi centrifugado por 1 min a 8000 rpm. O material foi então mantido sob refrigeração em freezer a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o momento da utilização.

Todas as amostras foram submetidas aos dois protocolos de extração de DNA para posterior análise por mPCR.

3.4. Multiplex PCR

Para efeitos deste estudo a mPCR realizada nas amostras que tiveram seu DNA extraído pelo método CTAB foi chamada de segunda análise e a realizada nas amostras com extração de DNA pelo kit DNeasy[®] foi chamada de terceira análise. A primeira análise, como relatado anteriormente, corresponde à análise feita por PCR simples no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia.

3.4.1. Iniciadores

Os iniciadores utilizados foram desenhados por Germini et al. (2004) e sintetizados pela Invitrogen. Suas seqüências, especificidade e tamanho do produto amplificado estão descritos nos QUADRO 2 e QUADRO 3.

As concentrações das soluções estoques dos iniciadores foram calculadas e estes diluídos com água purificada estéril e armazenados a -20°C até sua utilização.

QUADRO 2: Iniciadores utilizados na multiplex PCR e suas respectivas seqüências e especificidades.

INICIADOR	SEQÜÊNCIA (5' – 3')	ESPECIFICIDADE
P-E35S <i>for</i>	CATTTTCATTTGGAGAGGACACG	Promotor E35S
MON810 <i>rev</i>	GCATTCAGAGAAACGTGGCAGTA	Proteína do choque térmico 70
RR <i>rev</i>	TGGGGTTTATGGAAATTGGAA	Peptídeo de transito cloroplástico 4
MZ <i>for</i>	CGCCAGAAATCGTTTTTCAT	Gene da zeína do milho
MZ <i>rev</i>	GGTGGTGTCCTTGCTTCCTA	Gene da zeína do milho
SL <i>for</i>	ATGGGCTTGCCTTCTTTCT	Gene da lectina da soja
SL <i>rev</i>	CCGATGTGTGGATTTGGTG	Gene da lectina da soja
Bt11 <i>for</i>	CTGGGAGGCCAAGGTATCTAAT	Seqüência de intervenção 2 (IVS 2)
Bt11 <i>rev</i>	GCTGCTGTAGCTGGCCTAATC T	Fosfinotricina Acetil Transferase (PAT)
Ev176 <i>for</i>	CCCTTCAACTTCAGCAACGGCA	Cry1 Ab δ -toxina
Ev176 <i>rev</i>	TAGTCGGTCACGTCGGTCTTCAGG	Cry1 Ab δ -toxina

QUADRO 3: Pares de iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos amplificados para cada alvo

ALVO	PARES DE INICIADORES	TAMANHO DO AMPLIFICADO (EM PARES DE BASE)
MON810	P-E35S <i>for</i> MON810 <i>rev</i>	110
Roudup Ready	P-E35S <i>for</i> RR <i>rev</i>	125
Zeína do milho	MZ <i>for</i> MZ <i>rev</i>	139
Lectina da soja	SL <i>for</i> SL <i>rev</i>	157
Bt11	Bt11 <i>for</i> Bt11 <i>rev</i>	189
Evento 176	Ev176 <i>for</i> Ev176 <i>rev</i>	209

3.4.2. Condições para a PCR:

3.4.2.1. Controles Positivos:

- a) na reação de detecção de lectina, foi utilizado DNA extraído do material de referência correspondente a 1% de soja RR (ERM – BF410);
- b) na reação de detecção de zeína, foi utilizado DNA extraído do material de referência correspondente a 1% de milho Bt176 (ERM – BF411), 1% de milho Bt11 (ERM – BF412) e 1% de milho MON810 (ERM – BF413);
- c) na reação de detecção presuntiva de OGM, foi utilizado DNA extraído do material de referência contendo 1% de soja RR (ERM – BF410), 1% de milho Bt176(ERM – BF411), 1% de milho Bt11 (ERM – BF412) e 1% de milho MON810 (ERM – BF413).

3.4.2.2. Controles Negativos:

Nos controles negativos foram utilizados somente os reagentes sem nenhum DNA.

3.4.3. Preparo das Soluções de Amplificação

Os procedimentos da PCR foram executados em um volume final de 25 μ L com as seguintes concentrações de reagentes: PCR buffer 1X, $MgCl_2$ 3,5 mM, dNTPs 0,4 mM de cada, PLATINUM DNA Polymerase 0.15 U/ μ L (Invitrogen) e a

concentração final de cada iniciador foi 0,2 μM para MZ for e MZ rev, SL for e SL rev, Ev176 for e Ev176 rev; 0,4 μM para MON810 rev, RR rev; 0,6 μM para P-E35S for. Foram adicionados também 2 μL do DNA genômico extraído das amostras.

As soluções estoques de iniciadores foram diluídas para que no volume final de reação a concentração dos iniciadores estivesse de acordo com as descritas acima. O QUADRO 4 aponta a concentração das soluções estoque e o volume de iniciadores utilizados em cada reação.

QUADRO 4: Concentração das soluções estoques e volume final dos iniciadores utilizados.

INICIADOR	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (μM)	VOLUME POR REAÇÃO (μL)
P-E35S for*	10,25	1,5
RR rev	6,87	1,5
MON810 rev	6,62	1,5
MZ for	9,62	0,5
MZ rev	9,36	0,5
SL for	10,16	0,5
SL rev	9,14	0,5
Bt11 for	6,88	1,5
Bt11 rev	10,04	1,0
Ev 176 for	9,54	0,5
Ev 176 rev	8,72	0,6

*O iniciador P-E35S for foi utilizado simultaneamente para a amplificação do material genético correspondente à soja RR e ao milho MON810.

3.4.3.1. Reação de Amplificação

As amplificações foram realizadas em termociclador *Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research)* nas seguintes condições: pré - incubação a 95 °C por 10 min; 40 ciclos consistindo da desnaturação da dupla fita de DNA a 95°C por 50 segundos, anelamento do iniciador a 60 °C por 50 segundos; extensão do iniciador a 72 °C por 50 segundos; e extensão final a 72 °C por 5 min.

3.5. Eletroforese em Gel de Agarose:

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado com 1% a 3% de agarose, em tampão TBE (Tris Borato EDTA) 1,0X, sendo corados com 2 µL de solução de brometo de etídeo (10 mg/ mL). As condições de corrida foram: voltagem de 80 V por 30 min e depois 90 V por aproximadamente 3 horas em tampão TBE 1,0X.

O gel de agarose foi levado ao transiluminador BioRad sob luz ultravioleta e depois as imagens foram registradas em equipamento de fotodocumentação (*Image Master VDR – Pharmacia Biotech*) localizado no Departamento de Microbiologia.

3.6. Teste de Especificidades dos Iniciadores

A especificidade dos iniciadores foi testada realizando PCR simples adicionando o material genético extraído dos materiais de referência contendo 1% de OGM pelo método CTAB utilizando um par de iniciadores para cada reação.

3.7. Padronização da PCR Multiplex (mPCR)

A padronização da mPCR foi feita utilizando o DNA extraído pelo método CTAB dos materiais de referência. Em um único tubo de reação foram colocados todos os reagentes da mPCR e todos os DNAs dos padrões (dos materiais de referência correspondente aos milhos MON 810, Bt 11 e Bt 176 e a soja RR), como o controle positivo.

3.8. Teste de Robustez

O teste de robustez foi realizado para comprovar a eficiência, sensibilidade e especificidade da mPCR. Para tanto foram utilizadas duas marcas diferentes de microtubos de 200 µL (Axygen e Brand) e três diferentes modelos de termocicladores: *Peltier Thermal Cycler PTC-200 – MJ Research*, localizado no setor de Vacinas Bacterianas II do Departamento de Imunologia; *Gene Amp PCR Systems 2400 – Applied Biosystems*, localizado no Departamento de Microbiologia; e *Peltier Thermal Cycler PTC-200 – MJ Reserach* localizado no setor de Bactérias de Referência do Departamento de Microbiologia. Foi preparado um mix de mPCR para

doze reações: três controles negativos e três positivos (DNA extraído dos materiais de referência correspondentes a soja RR 1% e milhos Bt 11 1%, Bt 176 1% e MON 810 1%) nos tubos Axygen, e três controles negativos e três positivos nos tubos Brand. Os tubos foram devidamente identificados e levados aos termocicladores, de modo que um controle negativo e um controle positivo de cada marca de tubo ficasse em cada um dos termocicladores pré-programados para as mesmas condições de PCR.

3.9. Análise das amostras

Todas as 40 amostras tiveram o DNA extraído pelos dois diferentes métodos descritos e as amplificações desses materiais foram realizadas no termociclador *Peltier Thermal Cycler PTC-200 – MJ Research* localizado no setor de vacinas bacterianas II do Departamento de Imunologia. Após a obtenção dos resultados, as amostras foram reveladas assim como os resultados obtidos pela primeira análise realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia. A especificidade e a sensibilidade da mPCR foram calculadas utilizando como padrão ouro a PCR simples. Além disso, os resultados obtidos pela extração de DNA com método CTAB e pelo kit também foram comparados estatisticamente utilizando-se o teste qui-quadrado (χ^2).

3.10. Teste de Homogeneidade entre os Resultados Obtidos pela mPCR com os Diferentes Tipos de Extração de DNA

A homogeneidade dos resultados obtidos foi testada entre a primeira e segunda análise, entre primeira e a terceira análise, entre a segunda e terceira análise e entre as três análises em conjunto através do teste qui quadrado (χ^2), utilizando $p=0,05$ e grau de liberdade igual a 1.

3.11. Cálculo de especificidade e sensibilidade das análises

O método baseado em PCR deve ter um alto grau de acurácia analítica e diagnóstica. A acurácia diagnóstica considera os componentes desejados e os componentes não desejados na presença da matriz biológica e inclui os termos

especificidade e sensibilidade. A especificidade diagnóstica é definida como o grau de medida do quanto o método é afetado por componentes não desejados presentes na matriz biológica, que resulta em falso-negativos. A sensibilidade diagnóstica é definida como a medida do grau de detecção de microrganismos patogênicos desejados na matriz biológica (FREITAS, LEMOS & MARIN, 2006).

A acurácia de um método analítico é definida como a proporção de correspondência entre o valor determinado do analito e o valor verdadeiro. O método utilizado deve ser apropriado à matriz. Contudo, a acurácia pode ser medida de diferentes maneiras e uma delas é analisando a amostra com uma concentração conhecida, comparando o valor medido com o "valor verdadeiro". Todavia, um padrão de referência deve ser utilizado (padrão ouro). Pode também ser definida como o grau de correspondência entre a resposta obtida por PCR e a resposta obtida pelo método de referência em amostras idênticas. Acurácia diagnóstica é, portanto, igual às amostras positivas para a PCR e o método de referência, mais as amostras negativas para a PCR e o método de referência dividido pelo número total de amostras (SCHULTEN et al., 1997 apud FREITAS, LEMOS & MARIN, 2006).

Os cálculos de sensibilidade e especificidade foram realizados de acordo com a TABELA 1 utilizada para a comparação de dois testes diagnósticos (MEDRONHO & PEREZ, 2006).

TABELA 1: Tabela utilizada para cálculo de sensibilidade e especificidade através da comparação dos resultados obtidos por duas técnicas de diagnósticos distintas.

Método Teste	Padrão Ouro			Total
		Positivo	Negativo	
Positivo	a (verdadeiro positivo)	b (falso positivo)	a+b	
Negativo	c (falso negativo)	d (verdadeiro negativo)	c+d	
Total	a+c	b+d	a+b+c+d	

Fonte: MEDRONHO & PEREZ, 2006.

As tabelas utilizadas no trabalho foram montadas utilizando os resultados obtidos pela segunda e terceira análises, comparando-as com os resultados da primeira. No quadrante de verdadeiros positivos (a) foram colocados os resultados positivos obtidos pela segunda e terceira análises que corroboram com os resultados da

primeira análise. No quadrante de falsos positivos (b) foram colocados os resultados positivos para segunda e terceira análises, mas que foram divergentes dos resultados da primeira análise. No quadrante de falsos negativos (c) foram colocados os resultados negativos para segunda e terceira análises e que divergiram dos resultados de primeira análise. No quadrante de verdadeiros negativos foram colocados os resultados negativos para segunda e terceira análises que corroboraram com os resultados obtidos pela primeira análise.

De acordo com Medronho e Perez (2006), os cálculos de sensibilidade e especificidade são feitos como descrito a seguir:

Cálculo da sensibilidade:
$$S = \frac{a}{a+c}$$

Onde: S = sensibilidade; a = número de verdadeiros positivos; c = número de falsos negativos.

Cálculo de especificidade:
$$E = \frac{d}{b+d}$$

Onde: E = especificidade; d = número de verdadeiros negativos; b = número de falsos positivos.

4. RESULTADOS

Após obtenção dos resultados através da mPCR, a natureza das amostras foi revelada conforme o indicado no QUADRO 5. Ao lado do número da amostra está a identificação realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia.

QUADRO A: Identificação das amostras de alimentos realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia, INCQS – FIOCRUZ.

Amostra	Tipo de Alimento	Amostra	Tipo de Alimento
11	macarrão instantâneo	3397/03	mistura para bolos
15	macarrão instantâneo	4570/03	salsicha
007	sopa de legumes desidratada	4863/03	proteína texturizada de soja
027	missoshiro	5263/03	leite de soja
028	missoshiro	5264/03	sopão de galinha
030	sopa de milho e gergelim	010/05	extrato de soja
032	leite de soja	015/05	soja em grão
065	ração para cães	147/05	farinha de trigo
325/02	sopão de galinha	300/05	farinha de trigo
794/02	salsicha tipo viena	1283/05	fubá
795/02	sopão de galinha	2488/05	mistura para quiche de queijo
796/02	sopão de carne com macarrão	3323/05	farinha de trigo
798/02	ração para gatos	3325/05	proteína de soja temperada
2174/02	ração para cães	3328/05	pó para preparo de bebida (sabor banana)
1284/03	leite de soja	1537/06	fibra de soja
1286/03	ração para cães	2196/06	proteína texturizada de soja
1289/03	sopão de carne com macarrão	2115/07	proteína texturizada de soja
2124/03	sopão de carne	2116/07	farelo de soja peletizado
2126/03	ração para gatos	2118/07	farelo de soja
3314/03	sanavita complemento para reeducação alimentar (pó para preparo de alimentos)	2442/07	proteína texturizada de soja

4.1. Teste de especificidade dos iniciadores

Os iniciadores demonstraram ser específicos, amplificando os fragmentos esperados de DNA conforme demonstrado na FIGURA 1.

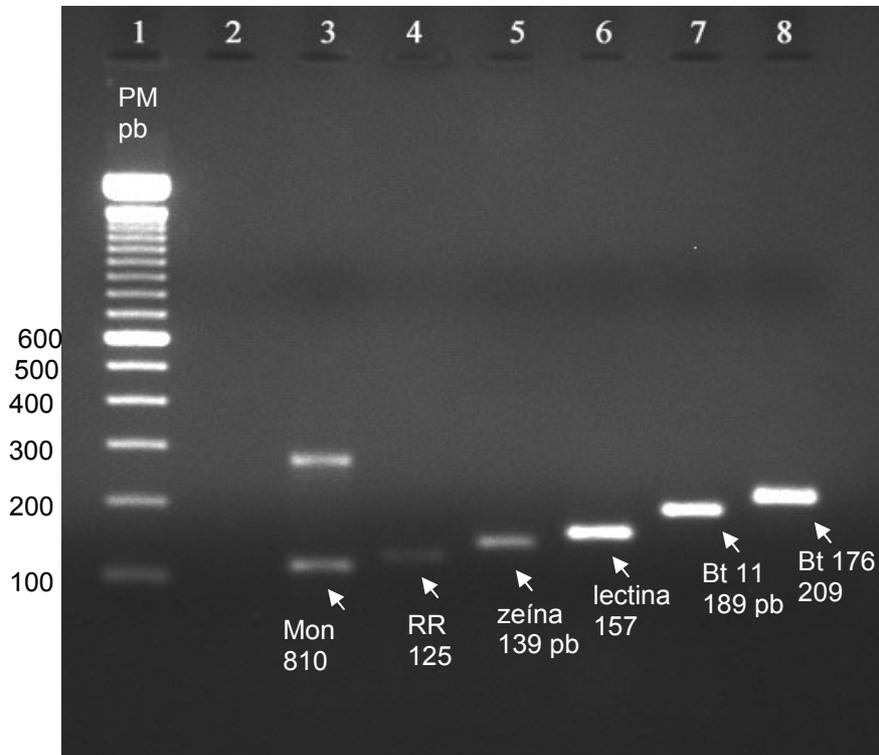


FIGURA 1: Perfil eletroforético, em gel de agarose a 1%, dos produtos da reação de PCR utilizando os iniciadores específicos para milho Bt176, milho Bt11, milho MON810, zeína, lectina e soja RR.

Raia 1: Padrão de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). Raia 2: controle negativo. Raia 3: controle positivo do milho MON810. Raia 4: controle positivo da soja RR. Raia 5: controle positivo da zeína. Raia 6: controle positivo da lectina. Raia 7: controle positivo do milho Bt11. Raia 8: controle positivo do milho Bt176.

O perfil eletroforético do teste de especificidade dos iniciadores desenhados por Germini et al., 2004, apresentou as bandas esperadas, exceto pelo aparecimento de uma banda inespecífica na raia correspondente ao milho MON 810 com peso molecular de aproximadamente 280 pb. Essa banda foi persistente em todas as reações de PCR simples de milho MON 810. No trabalho de Germini et al., 2004, também houve o aparecimento de duas bandas inespecíficas com pesos moleculares mais altos (380 e 700 pb).

4.2. Teste de Robustez

O teste de robustez comprovou a eficiência da mPCR. Mesmo em diferentes tipos de tubos e termocicladores, o resultado foi satisfatório, com o aparecimento de todas as bandas nas alturas esperadas. A FIGURA 2 apresenta os resultados encontrados pelo teste de robustez.

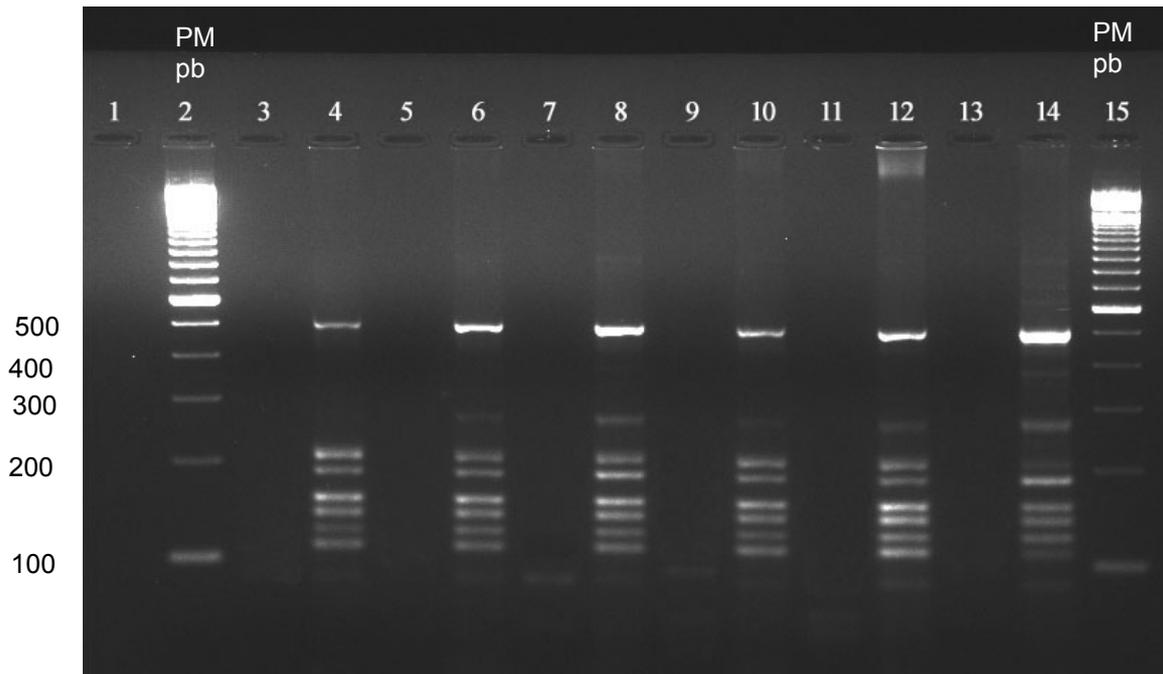


FIGURA 2: Perfil eletroforético, em gel de agarose a 3%, dos produtos da reação do teste de robustez para mPCR de zeína do milho, milhos Bt11, Bt176, MON810 e soja RR e lectina de soja.

Raias 2 e 15; padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen). Raias 3, 5, 7, 9, 11 e 13: controles negativos (sem DNA). Raias 4, 6, 8, 10, 12 e 14: controles positivos para zeína do milho, milhos Bt11, Bt176, MON810 e soja RR e lectina de soja. Raias 3 a 6: termociclador PTC 200 do Departamento de Imunologia INCQS-FIOCRUZ (Raias 3 e 4 microtubos de 200 µL da Axygen e Raias 5 e 6 microtubos de 200 µL da Brand). Raias 7 a 10: termociclador Applied Biosystems 2400 (Raias 7 e 8 microtubos de 200 µL da Axygen e Raias 9 e 10 microtubos de 200 µL da Brand). Raias 11 a 14: termociclador PTC 200 do Departamento de Microbiologia do INCQS-FIOCRUZ (Raias 11 e 12 microtubos de 200 µL da Axygen e Raias 13 e 14 microtubos de 200 µL da Brand). Banda correspondente ao gene do milho Bt176: 209 pb. Banda correspondente ao gene do milho Bt11: 189 pb. Banda correspondente ao gene da lectina da soja: 157pb. Banda correspondente ao gene

da zeína do milho: 139 pb. Banda correspondente ao gene da soja RR: 125 pb.
Banda correspondente ao gene do milho MON: 110 pb.

4.3. Análise das Amostras

Os primeiros resultados da análise das amostras por mPCR não foram satisfatórios. Apesar de uma boa visualização das bandas das amostras, algumas bandas esperadas no controle positivo (125 pb, 189 pb e 209 pb) não foram visualizadas. Além disso, uma banda apareceu no controle negativo na altura correspondente ao milho MON810 (110 pb) na raia 2 e ainda no controle negativo, na raia 10, apareceram duas bandas: a correspondente ao milho MON 810 e ao Bt 176 (209 pb) (FIGURA 3). O procedimento foi repetido por algumas vezes, mas a fraca visualização da banda correspondente ao gene RR e a persistência do aparecimento da banda na altura do milho MON810 no controle negativo impediram uma melhor análise dos resultados. A solução encontrada foi a de separar as análises quanto a presença dos milhos MON810, Bt11 e Bt176 e da zeína (mPCR de milhos), e quanto a presença de lectina e de soja RR (duplex PCR de soja RR).

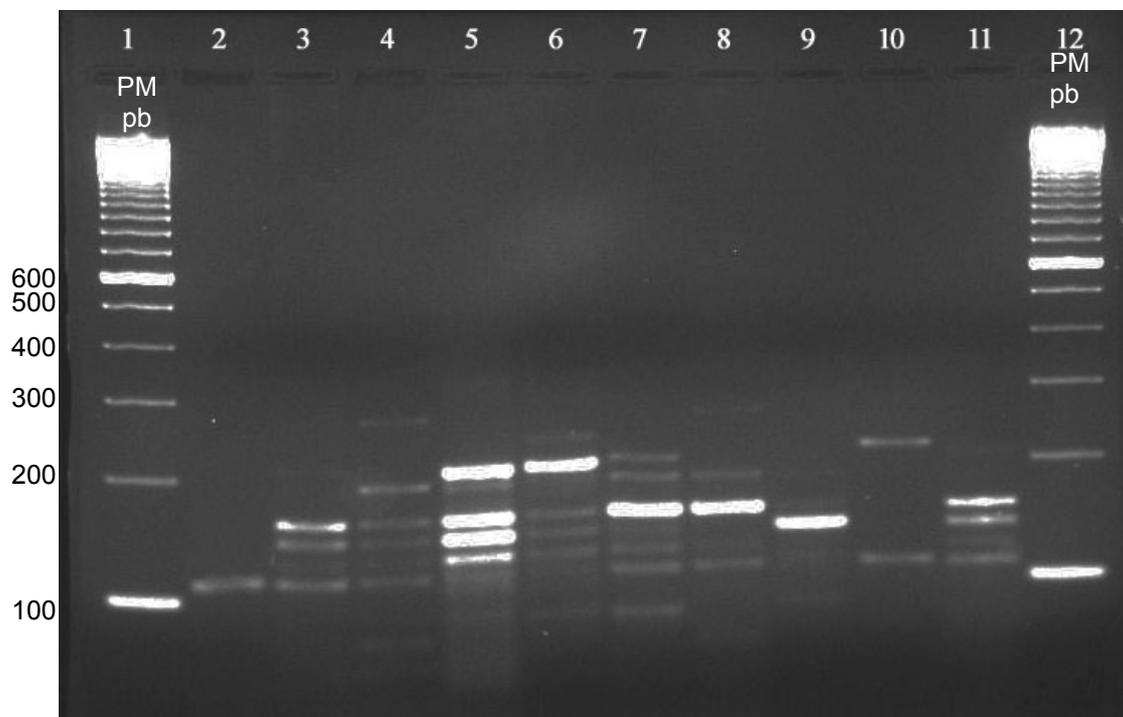


FIGURA 3: Perfil eletroforético, em gel de agarose a 3%, dos produtos da reação dos testes preliminares da mPCR das amostras 007 (Raia 4), 065 (Raia 5), 3397/03 (Raia 6), 4863/03 (Raia 7), 010/05 (Raia 8) e 1283/05 (Raia 9) para a detecção da presença dos genes de lectina da soja, soja RR, milho Bt11, milho Bt176 e milho

MON810 e zeína do milho. Raias 1 e 12: padrão de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen). Raias 2 e 10: controles negativos mPCR. Raias 3 e 11: controles positivos mPCR para lectina da soja, soja RR, milho Bt11, milho Bt176 e milho MON810 e zeína do milho.

4.4. Resultado da Pesquisa de Soja Geneticamente Modificada nas Amostras de Alimentos

A análise dos alimentos quanto à presença de soja RR pela duplex PCR demonstrou resultados nítidos e melhores para avaliação da presença ou não de OGM. O resultado do padrão de bandas da duplex PCR para soja RR está demonstrado na FIGURA 4.

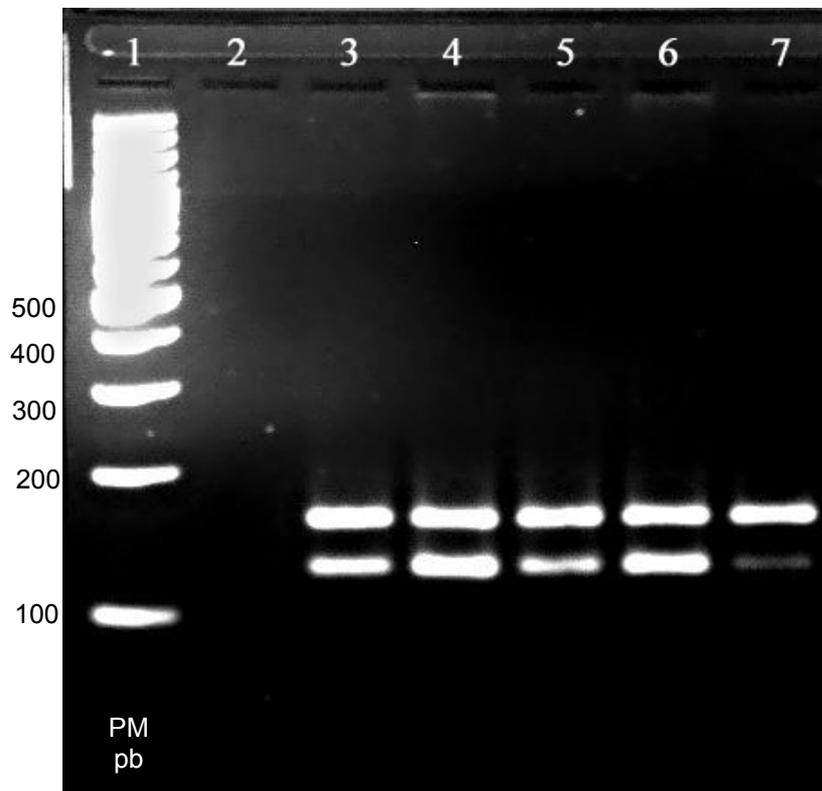


FIGURA 4: Perfil eletroforético, em gel de agarose a 3%, dos produtos da reação da duplex PCR para detecção de soja geneticamente modificada para tolerância ao herbicida glifosato (Roundup Ready[®]) (125 pb) e para o gene da lectina da soja (157 pb). Raia 1: padrão de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). Raia 2: controle negativo duplex PCR de soja. Raia 3: controle positivo para duplex PCR de soja. Raia 4: amostra 2116/07 extraída pelo método de CTAB. Raia 5: amostra 2442/07 extraída pelo método de CTAB. Raia 6: amostra 2116/07 extraída pelo Kit DNeasy. Raia 7: amostra 2442/07 extraída pelo Kit DNeasy.

Os resultados da segunda análise (com extração de DNA pelo método CTAB) demonstraram que, das 40 amostras observadas, 37 acusaram a presença soja através da detecção do gene da lectina e, entre estas, 28 amostras foram positivas para a presença do gene de tolerância ao glifosato.

Os resultados da terceira análise (extração de DNA pelo Kit DNeasy®) demonstraram que, das 40 amostras observadas, 32 acusaram a presença de soja através da detecção do gene da lectina e, entre estas, 22 amostras foram positivas para a presença do gene de tolerância ao glifosato.

Os resultados obtidos da análise das 40 amostras por duplex PCR de soja juntamente com os resultados de primeira análise (realizada por PCR simples pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do INCQS) para pesquisa de soja geneticamente modificada estão dispostos no QUADRO 6.

QUADRO 5: Resultados comparativos da primeira análise (realizada por PCR simples pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do INCQS), da segunda análise (com extração de DNA pelo método CTAB) e da terceira análise (extração de DNA pelo Kit DNeasy® Mini) obtidas pela duplex PCR de soja RR.

Amostra	Tipo de alimento	Primeira Análise		Segunda Análise		Terceira Análise	
		RR	Lectina	RR	Lectina	RR	Lectina
11	macarrão instantâneo	+	+	+	+	+	+
15	macarrão instantâneo	-	+	+	+	-	-
007	sopa de legumes desidratada	-	+	-	-	-	-
027	missoshiro	-	+	-	-	-	-
028	missoshiro	-	+	-	+	-	+
030	sopa de milho e gergelim	-	+	-	+	-	-
032	leite de soja	+	+	+	+	-	+
065	ração para cães	+	+	-	+	+	+
325/02	sopão de galinha	+	+	+	+	-	-
794/02	salsicha tipo viena	+	+	+	+	+	+
795/02	sopão de galinha	?*	+	+	+	+	+
796/02	sopão de carne com macarrão	-	+	-	+	-	+
798/02	ração para gatos	-	+	+	+	+	+
2174/02	ração para cães	-	+	+	+	-	-

Amostra	Tipo de alimento	Primeira Análise		Segunda Análise		Terceira Análise	
		RR	Lectina	RR	Lectina	RR	Lectina
1284/03	leite de soja	+	+	+	+	+	+
1286/03	ração para cães	-	-	+	+	+	+
1289/03	sopão de carne com macarrão	+	+	+	+	+	+
2124/03	sopão de carne	+	+	+	+	+	+
2126/03	ração para gatos	+	+	+	+	+	+
3314/03	sanavita (pó para preparo de alimentos)	+	+	+	+	+	+
3397/03	mistura para bolos	+	+	-	+	+	+
4570/03	salsicha	+	+	+	+	-	+
4863/03	proteína texturizada de soja	+	+	+	+	+	+
5263/03	leite de soja	+	+	+	+	+	+
5264/03	sopão de galinha	-	+	+	+	+	+
010/05	extrato de soja	+	+	-	+	-	+
015/05	soja em grão	-	+	-	+	-	+
147/05	farinha de trigo	+	+	+	+	+	+
300/05	farinha de trigo	-	+	-	+	-	-
1283/05	fubá	-	-	-	-	-	-
2488/05	mistura para quiche de queijo	+	+	-	+	+	+
3323/05	farinha de trigo	-	+	+	+	-	+
3325/05	proteína de soja temperada	+	+	+	+	-	+
3328/05	pó para preparo de bebida (sabor banana)	+	+	+	+	-	+
1537/06	fibra de soja	+	+	+	+	+	+
2196/06	proteína texturizada de soja	-	+	+	+	-	+
2115/07	proteína texturizada de soja	+	+	+	+	+	+
2116/07	farelo de soja peletizado	+	+	+	+	+	+
2118/07	farelo de soja	+	+	+	+	+	+
2442/07	proteína texturizada de soja	+	+	+	+	+	+

* A análise quantitativa realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular do INCQS apontou uma presença muito alta do promotor 35S e a presença do gene de lectina foi baixa, podendo estar relacionada a infecção por vírus.

+ : amostras positivas; - : amostras negativas.

4.4.1. Teste de Homogeneidade entre os Resultados Obtidos pela mPCR com os Diferentes Tipos de Extração de DNA

4.4.1.1. Lectina

Os resultados da segunda análise apresentaram-se homogêneos em relação aos resultados da primeira análise com valor de $\chi^2= 0,947368421$ quando comparados os valores positivos, e $\chi^2= 0,5$ comparando-se os valores negativos.

A comparação dos resultados da terceira análise com os resultados da primeira análise demonstrou que há homogeneidade entre os resultados positivos ($\chi^2= 0,947368421$). No entanto, quando comparadas as frequências dos resultados negativos, estas não se mostraram homogêneas, apresentando um valor de $\chi^2= 18$.

A homogeneidade entre os resultados de segunda e terceira análises só aconteceu entre os resultados positivos ($\chi^2= 0,973684211$). Os resultados negativos não foram homogêneos entre essas duas análises, com valor de $\chi^2= 18,5$.

Quando comparados os três métodos em conjuntos, tanto os resultados positivos como os negativos demonstram-se homogêneos com valores de $\chi^2= 0,579439252$ e $\chi^2= 4,769230769$, respectivamente (com graus de liberdade igual a 2 e $p=0,05$).

4.4.1.2. Soja RR

A comparação entre os resultados da primeira e da segunda análises demonstrou homogeneidade com valor de $\chi^2= 0,36$ para os resultados positivos e $\chi^2= 0,6$ para os resultados negativos.

Foi observada homogeneidade também entre os resultados de primeira e terceira análises, com valores de $\chi^2= 0,095744681$ para os resultados positivos e $\chi^2= 0,136364$ para os resultados negativos.

Os resultados de segunda e terceira análises também foram homogêneos quando comparados, apresentando valores de $\chi^2= 0,72$ para os resultados positivos e $\chi^2= 1,2$ para os valores negativos.

Os três métodos também apresentaram homogeneidade quando comparados em conjunto, tanto para os valores positivos ($\chi^2= 0,72$) como para os valores negativos ($\chi^2= 1,2$) utilizando $p=0,05$ e grau de liberdade 2.

4.4.2. Especificidade e Sensibilidade

A especificidade da duplex PCR de soja foi calculada a partir da comparação entre os resultados obtidos desta técnica com os da PCR simples (padrão ouro utilizado no INCQS). Na TABELA 2 e na TABELA 3 estão dispostas as comparações entre os resultados da duplex PCR de segunda análise (para o gene da lectina e o de tolerância ao glifosato, respectivamente) com os resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular.

TABELA 2: Comparação entre os resultados da duplex PCR (segunda análise) com os resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia (INCQS-FIOCRUZ) (primeira análise) para o gene da lectina de soja.

	Primeira Análise (INCQS - CTAB)			
		Positivo	Negativo	Total
Segunda Análise (Duplex - CTAB)	Positivo	37	1	38
	Negativo	1	1	2
Total		38	2	40

A comparação entre os resultados obtidos pela primeira e segunda análises na detecção do gene de lectina de soja, aponta que das 40 amostras analisadas, 38 tiveram o mesmo resultado para ambas as análises (37 positivas e 1 negativa). A duplex PCR apresentou somente 1 falso positivo e 1 falso negativo. Estes resultados indicam uma especificidade de 50% e uma sensibilidade de 97%.

TABELA 3: Comparação entre os resultados da duplex PCR (segunda análise) com os resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia (INCQS-FIOCRUZ) (primeira análise) para o gene de resistência ao glifosato

	Primeira Análise (INCQS - CTAB)			
		Positivo	Negativo	Total
Segunda Análise (Duplex - CTAB)	Positivo	21	7	28
	Negativo	4	8	12
Total		25	15	40

A observação dos resultados apresentados para a soja RR demonstra que das 40 amostras analisadas, 29 apresentaram resultados idênticos (21 positivos e 8 negativos), com 7 falso positivos e 4 falso negativos. Os cálculos realizados demonstram uma especificidade de 53% e uma sensibilidade e 84%.

Na TABELA 4 e na TABELA 5 estão dispostas as comparações entre os resultados da duplex PCR de terceira análise (para o gene da lectina e o de tolerância ao glifosato) com os resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular.

TABELA 4: Comparação entre os resultados da duplex PCR (terceira análise) com os resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia (INCQS-FIOCRUZ) (primeira análise) para o gene da lectina de soja

		Primeira Análise (INCQS CTAB)		
		Positivo	Negativo	Total
Terceira Análise (Duplex Kit)	Positivo	31	1	32
	Negativo	7	1	8
	Total	38	2	40

Os resultados apresentados para lectina tiveram uma especificidade de 50% e uma sensibilidade e 82%. Os resultados da terceira análise tiveram 32 respostas iguais as obtidas pela primeira análise (31 positivos e 1 negativo), apresentando 1 resultado falso positivo e 7 falso negativos.

TABELA 5: Comparação entre os resultados da duplex PCR (terceira análise) com os resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia (INCQS-FIOCRUZ) (primeira análise) para o gene de resistência ao glifosato.

		Primeira Análise (INCQS CTAB)		
		Positivo	Negativo	Total
Terceira Análise (Duplex Kit)	Positivo	19	3	22
	Negativo	6	12	18
	Total	25	15	40

O confrontamento dos resultados apresentados para a soja RR para primeira e terceira análises demonstraram 31 resultados compatíveis (19 positivos e 12 negativos), apresentando 3 falso negativos e 6 falso positivos. Os cálculos realizados indicaram uma especificidade de 80% e uma sensibilidade e 76%.

4.5. Resultado da Pesquisa de Milho Geneticamente Modificado nas Amostras de Alimentos

A análise dos alimentos quanto à presença dos milhos Bt11, Bt176 e MON810, além da pesquisa pelo gene de zeína utilizando a mPCR demonstrou resultados nítidos e melhores para avaliação da presença ou não destes milhos. O resultado do padrão de bandas da mPCR para os milhos transgênicos está demonstrado na FIGURA 5.

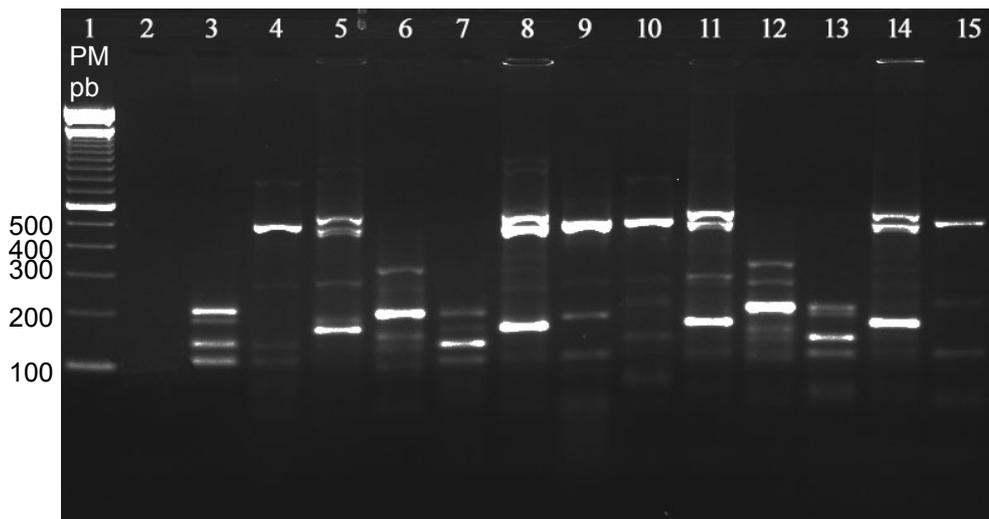


FIGURA 5: Perfil eletroforético, em gel de agarose a 3%, dos produtos da reação da mPCR para detecção dos genes da zeína do milho, e dos milhos Bt11, Bt176 e MON810. Raia 1: padrão de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). Raia 2: controle negativo da mPCR do milho. Raia 3: controle positivo da mPCR do milho. Raias 4, a 9: amostras extraídas pelo método CTAB (032, 794/02, 795/02, 2174/02, 4570/03, 015/05). Raias 10 a 15: amostras extraídas pelo Kit DNeasy Mini (032, 794/02, 795/02, 2174/02, 4570/03, 015/05).

Os resultados da segunda análise (com extração de DNA pelo método CTAB) demonstraram que, das 40 amostras observadas, 18 acusaram a presença de milho através da detecção do gene da zeína e, entre estas, 5 amostras foram positivas

para a presença de milho Bt11, 8 foram positivas para milho Bt176 e 10 foram positivas para o milho MON810.

Os resultados da terceira análise (extração de DNA pelo DNeasy® Mini Kit) demonstraram que, das 40 amostras observadas, 16 acusaram a presença de milho através da detecção do gene da zeína e, entre estas, 6 amostras foram positivas para a presença do milho Bt11, 7 foram positivas para o milho Bt176 e 11 amostras foram positivas para o milho MON810.

Os resultados obtidos da análise das 40 amostras por mPCR para detecção dos milhos Bt11, Bt176 e MON810 estão dispostos no QUADRO 7.

QUADRO 6: Resultados de segunda análise (com extração de DNA pelo método CTAB) e terceira análise (extração de DNA pelo Kit DNeasy® Mini) obtidos pela mPCR para detecção dos milhos Bt11, Bt176 e MON810.

Amostra	Tipo de Alimento	Segunda Análise				Terceira Análise			
		Zeína	Bt 11	Bt 176	MON 810	Zeína	Bt 11	Bt 176	MON 810
11	macarrão instantâneo	-	-	+	-	+	-	+	-
15	macarrão instantâneo	-	-	-	+	+	-	-	+
007	sopa de legumes desidratada	-	-	-	+		-	-	-
027	missoshiro	-	-	-	-	-	-	-	-
028	missoshiro	+	-	-	-	+	+	-	-
030	sopa de milho e gergelim	+	-	-	-	+	-	-	-
032	leite de soja	+	-	-	+	-	-	-	+
065	ração para cães	+	-	-	-	-	-	-	-
325/02	sopão de galinha	-	-	-	-	-	-	-	-
794/02	salsicha tipo viena	-	-	-	-	-	-	-	-
795/02	sopão de galinha	-	-	-	-	-	-	-	-
796/02	sopão de carne com macarrão	+	-	-	+	+	-	-	+
798/02	ração para gatos	+	-	+	-	+	-	+	-
2174/02	ração para cães	+	-	-	+	+	-	-	+
1284/03	leite de soja	-	-	+	-	-	-	+	-
1286/03	ração para cães	+	-	-	-	+	+	-	-
1289/03	sopão de carne com macarrão	+	-	-	+	+	-	-	+
2124/03	sopão de carne	+	-	-	-	+	-	-	-
2126/03	ração para gatos	+	-	+	-	+	-	-	-
3314/03	sanavita (pó para preparo de alimentos)	-	-	+	-	-	-	+	-
3397/03	mistura para bolos	+	+	+	-	-	-	-	-
4570/03	salsicha	+	-	-	-	+	-	-	-
4863/03	proteína texturizada de soja	-	+	-	-	-	+	-	+
5263/03	leite de soja	-	-	-	-	-	-	-	-
5264/03	sopão de galinha	-	-	+	-	-	-	+	-
010/05	extrato de soja	-	+	-	-	-	+	-	-

Amostra	Tipo de Alimento	Segunda Análise				Terceira Análise			
		Zeína	Bt 11	Bt 176	MON 810	Zeína	Bt 11	Bt 176	MON 810
015/05	soja em grão	-	+	-	+	-	+	-	+
147/05	farinha de trigo	+	-	-	+	+			+
300/05	farinha de trigo	-	-	-	-	-	-	-	-
1283/05	fubá	+	+	-	-	+	+	+	+
2488/05	mistura para quiche de queijo	-	-	-	-	-	-	-	-
3323/05	farinha de trigo	+	-	-	+	+	-	-	+
3325/05	proteína de soja temperada	-	-	-	-	-	-	-	-
3328/05	pó para preparo de bebida (sabor banana)	-	-	+	-	-	-	+	-
1537/06	fibra de soja	-	-	-	-	-	-	-	-
2196/06	proteína texturizada de soja	+	-	-	+	-	-	-	+
2115/07	proteína texturizada de soja	-	-	-	-	-	-	-	-
2116/07	farelo de soja peletizado	-	-	-	-	-	-	-	-
2118/07	farelo de soja	+	-	-	-	+	-	-	-
2442/07	proteína texturizada de soja	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : amostras positivas; - : amostras negativas

O Laboratório de Biologia Molecular não realizou a primeira análise de todas as amostras na pesquisa de milho geneticamente modificado em alimentos. Desta forma a análise de alguns alimentos quanto à presença de milho transgênico é inédita não sendo desta maneira, passível de comparações. As amostras analisadas e os resultados obtidos por este laboratório estão dispostos na QUADRO 8.

4.5.1. Teste de Homogeneidade entre os Resultados obtidos pela mPCR com os Diferentes Tipos de Extração de DNA.

A homogeneidade das amostras foi testada somente entre os resultados obtidos pela segunda e pela terceira análise através do teste qui quadrado (χ^2), utilizando $p=0,05$ e grau de liberdade igual a 1. O teste de homogeneidade não foi realizado para os resultados da primeira análise, pois a maioria das amostras não possuíam tais resultados. Como o teste de homogeneidade é uma análise de freqüências, o número de amostras diferentes poderia influenciar no teste, mascarando o resultado.

QUADRO 7: Resultados de primeira análise (realizada por PCR simples pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do INCQS) para pesquisa de milho geneticamente modificado.

Amostras	Zeína	Bt11	Bt176	MON810
11	+	NR	NR	NR
15	+	NR	NR	NR
007	+	NR	-	NR
027	+	NR	-	-
028	-	NR	NR	NR
030	+	NR	-	-
065	+	NR	NR	NR
796/02	+	NR	-	-
798/02	+	NR	NR	NR
2174/02	+	NR	NR	NR
1286/03	+	NR	NR	NR
1283/05	+	NR	NR	NR

+ : amostras positivas; - : amostras negativas; NR: análise não realizada

4.5.1.1. Zeína

Os resultados obtidos para zeína pela segunda e pela terceira análise apresentaram-se homogêneos, com valores de $\chi^2 = 0,222222$ para os resultados positivos e $0,181818$ para os valores negativos.

4.5.1.2. Bt11

A comparação entre os resultados de segunda e terceira análise para o milho Bt11, demonstrou que estes apresentam homogeneidade, com valor de $\chi^2 = 0,2$ para os valores positivos e $\chi^2 = 0,028571$ para os valores negativos.

4.5.1.3. Bt176

A homogeneidade também foi comprovada para os resultados encontrados para o milho BT176, tanto para os resultados positivos ($\chi^2 = 0,125$) quanto para os resultados negativos ($\chi^2 = 0,03125$).

4.5.1.4. MON810

Foi observada homogeneidade também entre os resultados obtidos para o milho MON810 com valores de $\chi^2= 0,1$ para os resultados positivos e $\chi^2= 0,033333$ para os resultados negativos.

5. DISCUSSÃO

Geralmente, o desenvolvimento da mPCR não é como a PCR convencional. À medida que o número de primers aumenta, o mesmo acontece com o número de possíveis interações entre os diferentes pares de iniciadores, podendo gerar dímeros de iniciadores. Além disso, as pequenas diferenças nas eficiências de amplificação para os diferentes pares de iniciadores podem resultar em amplificação preferencial de alguns dos produtos de PCR, deixando outros produtos em níveis sub-detectáveis. Assim, a concepção de um ensaio multiplex é uma tarefa difícil e complicada, onde o desenho dos iniciadores, as condições dos ciclos (incluindo o tempo de extensão, a temperatura de extensão, o tempo de anelamento, a temperatura de anelamento e número de ciclos de PCR), a quantidade de componentes da reação (incluindo iniciadores, dNTPs, cloreto de magnésio - $MgCl_2$, tampão de PCR, Taq DNA polimerase e a fita molde de DNA), bem como a utilização de adjuvantes devem ser cuidadosamente otimizados, a fim de detectar todos os DNA alvo presentes na amostra. A combinação de diferentes iniciadores pode resultar na amplificação de seqüências não-alvo; e quando há mais de um fragmento alvo sendo amplificado em uma reação de PCR, estes competirão pelos reagentes. Se um deles for amplificado com maior eficiência, a possibilidade de ocorrer um resultado falso negativo aumenta (CONCEIÇÃO, MOREIRA & BINSFELD, 2006; HEIDE et al., 2007).

Portanto, a escolha de um método previamente validado facilita sua utilização como forma de detecção e monitoramento, e assegura a identificação correta, seletiva e a medição precisa do analito de interesse. Evidências de que o método é realmente adequado ao que se pretende podem, também, ser obtidas através de comparações intra e interlaboratoriais (PONÇANO & CARVALHO, 2006).

O método desenvolvido por Germini et al. (2004) é um método aplicável à realidade do INCQS, pois a grande maioria dos produtos alimentares analisados é altamente processada, o que impede a utilização de métodos baseados na busca da proteína transgênica. Além disso, os amplicons obtidos nesta metodologia também são pequenos (menores que 210 pb) o que permite a detecção dos OGM, mesmo que o DNA tenha sido afetado durante o processamento dos produtos.

Os iniciadores desenhados por Germini et al. (2004) mostraram-se específicos, amplificando bandas dos tamanhos esperados. Embora a banda

correspondente à soja RR apareça de forma bem fraca, o resultado obtido ainda era o esperado.

O teste de robustez realizado demonstrou a sensibilidade da mPCR, observando-se o mesmo perfil eletroforético (com amplicons entre 110 e 209 pb) para as três reações de amplificação realizadas em tubos e termocicladores distintos, mostrando uma boa reprodutibilidade.

A busca de uma metodologia que melhor corresponda aos quesitos de especificidade, sensibilidade, robustez e que consiga detectar mais de um evento simultâneo na pesquisa por organismos geneticamente modificados para fazer com que os produtos comercializados estejam de acordo com a legislação vigente, faz da mPCR uma excelente escolha como método de detecção qualitativo, pois além de ser um método robusto, de boa especificidade e sensibilidade, reduz custos, graças a diminuição do número de reações, diminuindo também a quantidade de reagentes a ser utilizado, e reduz o tempo de análise já que em uma única observação obtém-se respostas para os diversos eventos procurados.

Apesar de um excelente resultado alcançado pela mPCR no teste de robustez, os primeiros resultados obtidos das análises das amostras não foram ideais. Não houve o aparecimento da banda correspondente à soja RR, que já se apresentava de forma fraca quando realizada a PCR simples, podendo ser atribuído à quantidade de DNA presente no tubo de reação ou mesmo estar relacionado à utilização simultânea do iniciador P-E35S para a amplificação das bandas correspondentes a soja RR e ao milho MON810, e, dependendo da quantidade de cada material genético disponível, este poderia tender à amplificação de um ou outro amplicon (ONISHI et al., 2005). Por este motivo as análises das amostras na procura de soja e milho geneticamente modificados foram separados, realizando-se desta forma a duplex PCR de soja (amplificação dos genes da lectina e da proteína EPSPS) e a mPCR de milho (amplificação do gene da zeína do milho e dos genes específicos aos milhos MON810, Bt11 e Bt176).

5.1. Pesquisa da soja geneticamente modificada

Apesar da aparente baixa especificidade demonstrada pelos cálculos, a duplex PCR para pesquisa de soja geneticamente modificada foi realizada com sucesso, havendo homogeneidade entre os resultados dos três métodos como demonstrado pelo teste χ^2 .

Os resultados para lectina obtidos com a extração pelo método CTAB foram semelhantes aos obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular, diferindo apenas em três amostras: 007 e 027 foram negativas e 1286/03 foi positiva na segunda análise. Deve-se levar em consideração que estas amostras estavam armazenadas há pelo menos três anos, havendo a possibilidade do DNA destas terem sofrido algum tipo de degradação, além daquela natural durante o processamento dos alimentos (HOLDEN et al., 2003).

A amplificação do material extraído pelo kit DNeasy, apresentou oito resultados diferentes quando comparado com a PCR simples realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular. Estes resultados possuem um perfil semelhante aos obtidos quando o método padrão foi comparado com o método CTAB, indicando que as amostras 15, 007, 027, 030, 325/02, 2174/02 e 300/05, mais antigas podem ter sofrido degradação de seu DNA com o passar do tempo, apresentando resultados negativos para a terceira análise. A amostra 300/05 é relativamente nova quando comparada com as demais. No entanto, esta se trata de farinha de trigo, que não deveria conter soja em sua composição, a não ser que esta informação estivesse contida no rótulo. Portanto a quantidade de lectina presente neste material deveria ser irrisória e de difícil detecção. Além disso, devido a sua pequena quantidade, o DNA da lectina pode não ter sido distribuído igualmente por toda a amostra durante o processo de homogeneização. A amostra 1286/03 (ração para cães) foi positiva na terceira análise, resultado confirmado pela segunda análise.

A comparação dos resultados obtidos pela segunda e terceira análise demonstra cinco divergências (amostras 15, 030, 325/02, 2174/02, 300/05) todas elas apontando resultados positivos para a segunda análise (resultados estes concordantes com a primeira análise). Estes resultados podem ser explicados porque a pureza do DNA pode ser severamente afetada por vários contaminantes nas matrizes alimentares, como por exemplo, polissacarídeos, lipídeos, polifenóis ou substâncias químicas utilizadas durante o processo de extração de DNA. Esta contaminação pode afetar o desempenho da PCR. Por exemplo, a *Taq* polimerase é inibida por polissacarídeos, EDTA, fenóis e duodecil sulfato de sódio (SDS) (ANKLAM et al., 2002).

O método CTAB parece ser eficiente para uma grande quantidade de alimentos vegetais, especialmente por separar bem o DNA dos polissacarídeos. Já os métodos que utilizam colunas com sílica (como o kit DNeasy) para a ligação do DNA, isolando este do material restante, são eficientes para a extração de DNA de

boa qualidade, no entanto, já foi relatado que os polissacarídeos tendem a se ligar à sílica, afetando desta forma a eficiência da separação do DNA, podendo alterar também a eficiência da PCR (ANKLAM et al., 2002).

Dos resultados da duplex PCR obtidos com o material extraído pelo método CTAB para a presença do gene *epsps*, onze divergiram dos resultados obtidos pelo Laboratório de Biologia Molecular. As amostras 065, 3397/03, 010/05 e 2488/05 apresentaram resultado negativo na segunda análise. Já as amostras 15, 798/02, 2174/02, 1286/02, 5624/03, 3323/05 e 2196/06 apresentaram um resultado positivo.

Quando comparados os resultados de primeira e terceira análises, 9 amostras (032, 325/02, 798/02, 1286/02, 4570/03, 5624/03, 010/05, 3325/05 e 3328/05) apresentaram divergências, sendo positivas para a terceira análise 798/02, 1286/02, 5624/03, estes últimos resultados concordantes com os resultados de segunda análise.

Os resultados divergentes encontrados entre as três análises podem estar relacionados em primeiro lugar à baixa concentração do transgene nas amostras, já que a legislação brasileira, Decreto nº 4680/03, determina um limite de 1% de material transgênico para rotulagem de produtos alimentares (BRASIL, 2003). Dessa forma as indústrias de alimentos estariam em conformidade com o limite determinado pela lei vigente, e neste caso, a concentração do transgene abaixo de 1% ocasionaria diferentes resultados pelo problema da homogeneização das amostras. Além disso, é relevante reforçar que a primeira análise, realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular, é sempre feita em triplicata, e o laudo liberado de acordo os resultados de maior observação.

5.2. Pesquisa do milho geneticamente modificado

Como já foi relatada anteriormente, a procura por milho geneticamente modificado foi realizado em poucas amostras na primeira análise, mesmo porque a pesquisa para a presença de milho só foi feita quando havia a indicação deste no rótulo do produto. Entretanto, todas as amostras, independentemente da rotulagem, foram submetidas à segunda e à terceira análises na busca por milho geneticamente modificado.

No que se refere a presença de zeína do milho, os resultados obtidos pela segunda e terceira análises foram comparados aos das amostras submetidas à primeira análise confirmando desta forma a especificidade do método.

Entre os resultados obtidos para detecção do milho Bt11, somente 3 (027, 1286/03 e 3397/03) foram discordantes entre a segunda e terceira análise.

No entanto o gene para o milho Bt11 foi detectado em amostras nas quais não foi constatada a presença de milho pela observação do fragmento de DNA correspondente a zeína (amostras 4863/03, 010/05 e 015/05), sendo que estas amostras são derivadas de soja (proteína texturizada, extrato e grãos de soja, respectivamente). Existem eventos de soja geneticamente modificados como, por exemplo, os produzidos pela Bayer CropScience: A2704-12, A2704-21, A5547-35, A5547-127, GU262, W62 e o W98, que foram produzidos para serem tolerantes a herbicidas. Estas linhagens de soja possuem como marcador de seleção o gene *pat*, que codifica para resistência ao antibiótico fosfotricina, clonado de um microorganismo comum do solo o *Streptomyces viridochromogenes* estirpe Tu494. Esse mesmo marcador de seleção é utilizado na produção de milho Bt11. O iniciador Bt11 *rev*, utilizado no presente estudo é específico para a região correspondente ao gene *pat*. Desta forma surgem duas possibilidades: a primeira, relacionada à presença de alguma das linhagens de soja geneticamente modificada nesta amostragem e por consequência, o anelamento do iniciador a este material genético e em segundo lugar o material estar contaminado com o próprio microorganismo, que é comumente presente em solos (STACKEBRANDT et al., 1991; AGBIOS, 2008a).

As análises realizadas para pesquisa de milho Bt176 diferiram em apenas 3 amostras: 2123/03, 3397/03 e 1283/05, sendo as duas primeiras positivas para a segunda análise e a última positiva para terceira análise. Os demais resultados foram concordantes.

As amostras 11, 798/02, 2126/03 e 3397/03 apresentaram, em pelo menos uma das análises, a observação do milho Bt176 através da detecção dos amplicons correspondentes ao gene da zeína e do gene específico ao milho Bt176.

Em algumas amostras, foi detectada a presença do gene para o milho Bt176, porém a presença de milho não foi identificada com a observação do fragmento correspondente ao gene da zeína do milho. Foram elas: 1284/03 (leite de soja), 3314/03 (pó para preparo de alimentos), 5264/03 (sopão de galinha) e 3328/05 (pó para preparo de bebida, sabor banana). Os pares de iniciadores utilizados foram desenhados para amplificar o gene específico que codifica para a δ -toxina Cry1 Ab, presente em bactérias do solo conhecidas como *B. thuringiensis* (GERMINI et al., 2004). Nos dias atuais existem vários vegetais geneticamente modificados para

possuírem a característica de resistência a insetos (soja, tomate, batata, algodão, trigo, além do próprio milho) (AGBIOS, 2008b) e é possível que algum destes estivesse presente nos ingredientes de alguns dos alimentos. Além disso, há a possibilidade, de que, em alguns dos produtos, estivesse presente a bactéria ou mesmo seu material genético.

As amostras 007 (sopa de legumes), 4863/03 (proteína texturizada de soja) e 1283/05 (fubá) apresentaram resultados distintos quando submetidas aos dois tipos de extração de DNA realizados no presente estudo. Enquanto a primeira foi positiva para a segunda análise, as outras duas foram positivas para a terceira análise.

A detecção da presença de milho MON810 foi feita através da mPCR para as amostras 15 (macarrão instantâneo), 032 (leite de soja), 796/02 (sopão de carne), 2174/02 (ração para cães), 1289/03 (sopão de carne), 147/05 (farinha de trigo), 1283/05 (fubá), 3323/05 (farinha de trigo) e 2196/06 (proteína texturizada de soja), com a visualização de ambos amplicons de zeína do milho e do gene específico para o milho MON810 em pelo menos uma das análises.

A presença do milho Bt176 na amostra 032, 2196/06 e 3323/05, pode ser explicada pelo fato de que um dos iniciadores utilizados para amplificação do fragmento correspondente ao milho MON810 (*P-E35S for*), ser o mesmo utilizado para amplificação do fragmento correspondente ao gene EPSPS, encontrado na soja RR, pois este se anela na região correspondente ao promotor 35S presentes em ambas as construções. É possível que tenha havido contaminação destas amostras por milho MON810, já que a presença da zeína do milho também foi detectada em ambas. Outra possibilidade é a contaminação com o vírus do mosaico da couve-flor ou com seu material genético (KOK et al., 2002).

Entre as quarenta amostras analisadas, quatorze apresentaram positividade simultânea para zeína e algum dos tipos de milhos pesquisados. Dessas, nove foram positivas para o milho MON810 (15, 032, 796/02, 2174/02, 1289/03, 147/05, 1283/05, 3323/05 e 2196/06), três foram positivas para o milho Bt11 (028, 3397/03 e 1283/05) e cinco foram positivas para o milho Bt176 (11, 798/02, 2126/02, 3397/03 e 1283/05). Duas amostras apresentaram-se positivas para mais de um tipo de milho geneticamente modificado: 3397/03 (Bt11 e Bt176) e 1283/05 (MON810, Bt11 e Bt176).

Existem poucas descrições disponíveis na literatura sobre a utilização de metodologias de PCR para análise qualitativa de milho GM em alimentos e rações disponíveis para comercialização.

Ortiz-García et al. (2005) utilizaram a PCR simples para detectar a presença de OGM entre as cultivares milhos de Oaxaca, no México, tendo como alvos o promotor 35S e o terminador NOS, não achando evidências da presença de material transgênicos nas amostras analisadas, resultado confirmado por análise quantitativa (Real Time PCR).

A *Food Safety Authority of Ireland* (Autoridade de Segurança Alimentar da Irlanda) realizou, em 2001, uma sondagem em salgadinhos de milho (tortilla chips e taco shells), analisando 26 amostras, que tiveram sua extração de DNA e PCR realizadas em duplicata. Onze amostras foram positivas para pelo menos um dos tipos de milho a seguir Bt176, Bt11, MON801, MON802, MON809 and MON810. Em estudos anteriores foram detectados OGMs em hambúrgueres, alimentos processados contendo frango, cream cheese, salsichas, sementes de soja, rolinhos primavera e salgadinhos de milho.

Yamaguchi et al. (2003) detectaram a presença de quatro tipos de milho (MON810, Bt11, Bt176 e T25) em sementes de milho coletadas nos portos de Tokyo, Yokohama, Nagoya e Shimizu, todos no Japão, locais onde desembarcam os milhos provenientes dos Estados Unidos. O milho MON810 foi o de maior predominância entre os transgênicos detectados por este grupo. Os resultados obtidos por PCR foram confirmados por ELISA.

Chiueh et al. (2002), em Taiwan, avaliaram a presença de seis variedades de milho geneticamente modificado (Bt176, Bt11, MON810, T25, GA21 e CBH-351) em espigas de milho congeladas, milho em conserva, batatas fritas (tipo chips) e salgadinhos de milho (tortilha chips). Os resultados mostraram que quatro amostras de milho em conserva e cinco amostras de milho congeladas continham duas variedades de milho GM (MON810 e T25). Uma amostra de milho enlatado continha a variedade de milho MON810. Em nenhuma das amostras foram detectados os eventos Bt11, GA21, e Bt176. Dez amostras da batata chip testadas continham milho o MON810 GM. Todas as 21 amostras de salgados de milho testadas foram positivas para as variedades MON810 e Bt11; em nenhuma das amostras foram detectados o milho CBH-351. Em quinze das vinte e uma amostras testadas anteriormente continham 5 variedades de milho GM (Bt176, MON810, Bt11, T25, e GA21).

Como registrado em alguns relatos, a predominância do milho GM MON810 também foi demonstrada pela mPCR realizada neste estudo. Em menor quantidade foram encontrados os outros eventos de milho transgênicos analisados. É

importante lembrar que o número de amostras analisadas pelo presente estudo é menor que as dos estudos realizados por outros laboratórios e que nenhum milho GM foi aprovado ainda no Brasil, realidade diferente da encontrada em alguns países (GREINER & KONIETZNY, 2008).

5.3. Considerações finais

Vale lembrar que as amostras avaliadas quanto a presença de transgênicos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde são todas, submetidas a análise fiscal, sendo efetuada sobre o alimento apreendido pela autoridade fiscalizadora competente em caráter de rotina, para apuração de infração ou para verificação de ocorrência fortuita ou eventual, para estar em conformidade com a legislação (DA SILVA, 2004), sendo sempre realizada em triplicata para confirmação da presença do OGM, para emissão de um laudo conclusivo.

As amostras avaliadas no presente estudo foram submetidas a dois tipos de análise, ambas por mPCR, porém cada uma com um tipo de extração de DNA. É possível que se tivessem sido realizadas em triplicata, resolvessem as dúvidas pendentes quanto à presença ou ausência de transgênicos, já que outras questões devem ser levadas em consideração quando o método de análise é a PCR (quantidades e concentrações de DNA, anelamento entre iniciadores, presença de nucleases, entre outros aspectos). Apesar dessas questões, o método mostrou-se sensível e específico amplificando os fragmentos esperados e confirmando a maioria dos resultados obtidos pelas análises realizadas pelo Laboratório de Biologia Molecular.

O presente estudo verificou também que um melhor resultado é obtido quando são analisados simultaneamente somente eventos pertencentes a um mesmo vegetal, o mesmo resultado foi observado em outros trabalhos utilizando-se outro protocolo de mPCR. Por exemplo, Hurst, Knight & Bruce (1999) pesquisaram soja RR e milho Bt176 separadamente, James et al. (2003) pesquisaram soja RR, quatro linhagens de milho (Bt176, Bt11, MON810 e T14/25) e quatro linhagens de canola (GT73, HCN92/28, MS8/RF3 e Oxy 235), separadamente, Onishi et al. (2005) desenvolveram uma metodologia de mPCR para a detecção simultânea de oito eventos de milho geneticamente modificados (Bt11, Event176, GA21, MON810, MON863, NK603, T25, and TC1507), Hernández et al. (2005) descrevem um

método de mPCR para detecção simultânea de quatro linhagens de milho geneticamente modificadas (Bt11, MON810, T25, and GA21), Liu et al. (2005) realizaram a detecção de soja RR por duplex PCR. Germini et al. (2004), propuseram um método para a detecção simultânea de quatro linhagens transgênicas de milho (MON810, Bt11, Bt176 e GA21) e da soja RR. No entanto, a reprodução deste trabalho não foi possível, somente foram visualizadas todas as bandas quando os eventos de soja e milho foram analisados separadamente.

Apesar de serem necessárias duas reações separadas para milho e soja, a mPCR de ambos mostrou ser capaz de detectar os eventos transgênicos e é uma ótima ferramenta qualitativa para o rastreamento e monitoramento de organismos geneticamente modificados em alimentos. Trata-se de um método que reduz custos e tempo de análise já que reduz o número de reagentes a serem utilizados e o número de reações e observações a serem feitas, selecionando os produtos que deverão ser submetidos a uma análise qualitativa (já realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do INCQS) indicando quais devem ser rotulados, adequando-se a lei vigente e dando ao consumidor o direito de escolha do produto que irá utilizar. Além disso, serve como instrumento de fiscalização e monitoramento aos produtos GM não autorizados, como os milhos transgênicos encontrados em algumas amostras de alimentos analisadas neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados e dos argumentos discutidos anteriormente conclui-se que:

- A técnica foi padronizada de forma que a presença de organismos geneticamente modificados fosse detectada com clareza, sendo que, para que isso se tornasse possível, as detecções dos eventos de milho e de soja transgênicos tiveram que ser analisados separadamente;
- As quarenta amostras reavaliadas pela mPCR tiveram seus resultados confirmados com eficiência, mesmo quando submetidas a dois diferentes métodos de extração de DNA (método CTAB e Dneasy Mini Kit, da Qiagen);
- As duas metodologias de extração de DNA utilizadas não interferem nos resultados obtidos pela mPCR, quando estes são comparados entre si e com os resultados obtidos pela PCR simples;
- A utilização de uma análise em triplicata pode resolver o dilema estabelecido quando uma só análise é feita em cada produto.
- Os resultados observados indicam que a mPCR pode ser utilizada como método para detecção e monitoramento de organismos geneticamente modificados, pois reduz o custo e o tempo de execução das análises, permitindo que os laudos sejam liberados mais rapidamente e que os produtos estejam em conformidade com a legislação, respeitando o direito e a saúde humana.

7. REFERÊNCIAS

AGBIOS. **Database product description MON-Ø4Ø32-6(GTS 40-3-2)**. Information on Genetically Modified approved products. Canadá, jul. 2005a. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=25>>. Acesso em: 16 set 2007.

AGBIOS. **Database product description SYN-BTØ11-1(bt11(X4334CBR, X4734CBR))**). Information on Genetically Modified approved products. Canadá, jul. 2005b. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=18>>. Acesso em: 16 set 2007.

AGBIOS. **Database product description MON-ØØ81Ø-6(MON810)**. Information on Genetically Modified approved products. Canadá, jul. 2005c. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=9>>. Acesso em: 16 set 2007.

AGBIOS. **Database product description SYN-EV176-9(176)**. Information on Genetically Modified approved products. Canadá, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=31>>. Acesso em: 16 set 2007.

AGBIOS. **Information on genetically modified approved products**. Canadá Disponível em : <<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&hstIDXCode=8&trCode=GLUPH>>. Acesso em: 11 jan. 2008a.

AGBIOS. **Information on genetically modified approved products**. Canadá. Disponível em : <<http://www.agbios.com/dbase.php>>. Acesso em: 11 jan. 2008b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimento geneticamente modificado: critérios garantirão mais segurança. **Notícias da ANVISA**, jul. 2007. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2007/240707.htm>>. Acesso em 10 jan. 2008.

ALEXANDROVA, N.; GEORGIEVA, K.; ATANASSOV, A. Biosafety regulations of gmos: national and international aspects and regional cooperation. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 19, p. 153 – 172, 2005.

AMARANTE JUNIOR, O. P et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quimica Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

AMBIENTEBRASIL. **Qualidade de Vida e a Biotecnologia**. 2004. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./biotecnologia/index.html&conteudo=./biotecnologia/artigos/vida.html>>. Acesso em: 15 jan. 2008.

ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia Molecular do Processo de Infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, set.–out., 2003

ANEZ, T. L. W. Organismos geneticamente modificados: uma abordagem à luz do direito nacional e internacional. **Revista da Faculdade de Direito da Universidade Federal do Paraná**, v. 43 p. 1-12, 2005.

ANKLAM, E. et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **European Food Research Technology**. v. 214, p. 3-26, 2002.

BARBOSA, J. M. **Estudo de fatores que influenciam o processo de transformação genética em critos via *Agrobacterium tumefaciens***. Piracicaba: USP, 2002. 51p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba

BARROS, L. M. G.; VIANA, A. A. B.; CARNEIRO, M. Aprendendo com as agrobactérias. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 32, jan.-jun., 2004.

BATES, G. W. Genetic transformation of plants by protoplast electroporation. **Molecular Biology**, v. 2, p. 135-144, 1994.

BAUMÜLLER, H. Domestic Import Regulations for Genetically Modified Organisms and their Compatibility with WTO Rules. **Trade Knowledge Network**, 44 p., aug., 2003.

BENEDITO, V. A.; FIGUEIRA, A. V. O. Segurança ambiental. In: **Biotecnologia e Meio Ambiente**. UFV, 2004. p. 149-176

BOBROWSKI, V. L. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.1, p.843-850, set-out, 2003.

BORÉM, A.; MILACH, S.C.K. Melhoramento de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.7, p.68-72, 1999.

BRASIL. ANVISA. Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília. DF, 03 maio 1999.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição [da] República Federativa do Brasil**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constitui%C3%A7ao.htm>. Acesso em: 15 dez. 2007.

BRASIL. Decreto nº 4680 de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei no 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,964715&_dad=portal&_schema=PORTAL>. Acesso em: 01 maio 2006.

BRASIL. Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005. Regulamenta dispositivos da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, que regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/_Ato2004-2006/2005/Decreto/D5591.htm> . Acesso em: 15 dez. 2007.

BRASIL. Decreto nº 6.041, de 8 de fevereiro de 2007. Institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências. Disponível em:< http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6041.htm>. Acesso em: 22 nov. 2007.

BRASIL. 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. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/1034.html>>. Acesso em: 28 out 2006.

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. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/1043.html>>. Acesso em: 28/05/2006.

BRASIL. Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001. Acresce e altera dispositivos da Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e dá outras providências. Disponível em: < <http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/MPV/2191-9.htm>>. Acesso em: 04 jun. 2006.

BRASIL. Portaria nº 2658, de 22 de dezembro de 2003. Define o símbolo de que trata o art. 2º, § 1º, do Decreto 4.680, de 24 de abril de 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,964543&_dad=portal&_schema=PORTAL>. Acesso em: 04 jun. 2006.

BRASIL: Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil/leis/L8078.htm>>. Acesso em: 01 maio 2006.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. GM crops: the first ten years - global socio-economic and environmental impacts. **ISAAA Brief**, n. 36, 2006.

CARDARELLI, P.; et al. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. **Food Control**, v. 16, p. 859-66, 2005.

CARTER, C. A. International approaches to the labeling of genetically modified foods. **Agricultural and Resource Economics Update**, v. 6, n. 1, p 1-6, set.-out., 2002.

CARTER, C. A.; GRUERE, G. P. International Approaches to the Labeling of Genetically Modified Foods. **Agricultural Marketing Resource Center**, p. 1-6, mar., 2003.

CAVALLI, S. B. Segurança alimentar: abordagem dos alimentos transgênicos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, p. 41-46, 2001.

CHASSY, B. et al. Improved nutritional quality through modern biotechnology. In: Nutritional and safety assessments of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 3, p. 50-63, 2004.

CHIUEH, L. C.; CHEN, Y. L.; SHIH, D. Y. C. Study on the detection method of six varieties of genetically modified maize and processed foods. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.10, n.1, p. 25-33, 2002.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Principles for the risk analysis of foods derived from modern biotechnology**. CAC/Guide Line 44. 2003a. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/biotech/en/codex_biotech_principles.pdf>. Acesso em 27 abr 2007.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants**. CAC/Guide Line 45. 2003b. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/biotech/en/codex_guidelines_plants.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2007.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Technical conclusive opinion**. Set. 1998. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3664.html>>. Acesso em: 01 maio 2007.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Previous conclusive technical opinion**. Mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3663.html>>. Acesso em: 01 maio 2007.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Extrato de parecer técnico Nº 1.099/2007**. Diário Oficial da União, n. 171, p. 1677-7042, 4 set. 2007a.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Extrato de parecer técnico Nº 1.100/2007**. Diário Oficial da União, n. 171, p. 1677-7042, 4 set. 2007b.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n.1, p.315-324, jan-fev, 2006.

CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA. **Protocolo de Cartagena sobre biossegurança**. Disponível em: <<http://www.cdb.gov.br/cartagena>>. Acesso em: 28 maio 2006.

CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. Disponível em: <<http://www.cbd.int/meetings/cop8mop3/mop-03.shtml/>>. Acesso em: 15 jan. 2008.

COSTA, T. E. M. M., et al. Avaliação de risco dos organismos geneticamente modificados. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, 2007. Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/cienciaesaudecoletiva/artigos/artigo_int.php?id_artigo=1097>. Acesso em: 22 nov. 2007.

DA SILVA, A. C. P. Laboratório oficial na avaliação analítica. In: ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2004. p. 271- 301.

ELNIFRO, M. E., et al. Multiplex PCR: Optimzation and Application in Diagnostic Virology. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 13, n. 4, p. 559-570, out. 2000.

FARIA, L. E; SANTOS, N. Biotecnologia: implicações jurídicas e bioéticas. **Revista Jurídica FAFIBE**. out, 2007. Disponível em: <http://revistajuridica.fafibe.br/arquivos/biotecnologia_implicacoes_juridicas_e_bioetic.pdf>. Acesso em 17 jan 2008.

FERNANDEZ-CORNEJO, J.; CASWELL, M. The first decade of genetically engineered crops in the United States. **Economic Research Service**, n. 11, Apr., 2006. Disponível em: < <http://www.ers.usda.gov/Publications/EIB11/>>. Acesso em: 23 set. 2007.

FERREIRA, M. G. R. et al. Introdução de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schumm.) usando biobalística. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.1, p.279-280, jan-fev, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Safety assessment of foods derived from genetically modified animals, including fish, a joint FAO/WHO expert consultation on food derived from biotechnology**. 2003. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/biotech/meetings/ec_nov2003/en/> Acesso em: 01 maio 2007.

FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND. **Survey of tortilla chips and taco shells for genetically modified ingredients.** Maio, 2001. Disponível em: <http://www.fsai.ie/surveillance/food_safety/gm_novel/tortilla_survey.pdf>. Acesso em 10 jan. 2008.

FOOD SAFETY DEPARTMENT/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Modern food biotechnology, human health and development: an evidence-based study.** Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety>>. Acesso em: 28 out. 2006.

FORTE, V. T. et al. A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize. **Food Control**, v. 16, p. 535-539, 2005.

FREITAS, E. I.; LEMOS A. A.; MARIN, V. A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.11, n. 4, p.1073-1083, 2006.

FRIZZAS, M. R.; CUNHA, U. S.; MACEDO, L. P. M. Plantas Transgênicas resistentes a insetos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 13-18, jan-mar, 2004.

FUNGUETTO, C. I. et al. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n.1, p.130-138, 2004.

GERMINI, A., et al. Development of a seven-target Multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, n.11, p. 3275-80, 2004.

GREENPEACE. **Ibama e Anvisa contestam CTNBio e pedem anulação da liberação de milho transgênico.** Jul., 2007. Disponível em: <<http://www.greenpeace.org/brasil/transgenicos/noticias/ibama-e-anvisa-contestam-ctnbi>>. Acesso em: 17 jan. 2007.

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.

GRUÈRE, G. P; RAO, S. R. A review of international labeling policies of genetically modified food to evaluate India's proposed rule. **AgBio Forum**, v. 10, n. 1, p. 51-64, 2007.

GUERRANTE, R. S. **Transgênicos: uma visão estratégica**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

GUTIÉRREZ, A. M. et al. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. **e-Gnosis [online]**, v.1, 2003. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/730/73000104.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2007.

HASLBERGER, A. G. Need for an “integrated safety assessment” of GMOs, linking food safety and environmental considerations. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3173-3180, 2006.

HEIDE, B. R.; HEIR, E.; HOLCK, A. Detection of eight GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and Fluorescence capillary gel electrophoresis. **European Food Research and Technology**. set. 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/d704g7h22071t0w9/>>. Acesso em: 27 jan 2008.

HENEGARIU, O., et al. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **BioTechniques**. v. 23, n. 3, p. 504-511, out. 1997.

HERNANDEZ, M., et al. Interlaboratory transfer of a PCR Multiplex method for simultaneous detection of four genetically modified maize lines: Bt11, MON810, T25, and GA21. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 3333-3337, 2005.

HOLDEN, M. J. et al. Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p. 2468–2474, 2003.

HOLST-JENSEN, A. et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**., v. 8, n.375, p. 985-993, 2003.

HURST, C. D.; KNIGHT, A.; BRUCE, I. J. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. **Molecular Breeding**, v.5, p.579–586, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE OPINIÃO PÚBLICA E ESTATÍSTICA. **Produtos com ingredientes transgênicos devem trazer a informação no rótulo**. jan. 2003. Disponível em: <http://www.ibope.com.br/calandraWeb/servlet/CalandraRedirect?temp=6&proj=PortallBOPE&pub=T&db=caldb&comp=pesquisa_leitura&nivel=null&docid=FEBCFCAC4834AA0283256EA20065E173>. Acesso em: 10 jan. 2008.

JAMES, C. **Situação Global da Comercialização das Lavouras GM: 2006**. Sumário Executivo 35 International Service for the Acquisition of Agro-Biotech Applications (ISAAA). 2006. Disponível em: < <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/35/executivesummary/pdf/Brief%2035%20-%20Executive%20Summary%20-%20Portuguese.pdf> >. Acesso em: 27 abr. 2007.

JAMES, D., et al. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by Multiplex PCR analysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 5829-5834, 2003.

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

KÖNIG A.; et al. Assessment of safety of foods derived from (GM) crops. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1047-88, 2004.

KUIPER, H. A. et al. Concluding remarks. **Food and Chemical Toxicology**, v. 7, n. 42, p.1195-1202, 2004.

KULIKOV, A. M. Genetically modified organisms and risk of their introduction. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, n. 1, p. 99-111, 2005.

LIU, Y. C., et al. Detection of genetically modified soybean and its product tou-kan by polymerase chain reaction with dual pairs of DNA primers. **European Food Research and Technology**, v. 221, p. 725–730, 2005.

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

MALATESTA, M.; et al. Reversibility of hepatocyte nuclear modifications in mice fed on genetically modified soybean. **European Journal of Histochemistry**, v. 49, n. 3, p. 237-242, 2005.

MALATESTA, M.; et al. Ultrastructural analysis of pancreatic acinar cells from mice fed on genetically modified soybean. **Journal of Anatomy**, v. 201, p. 409-415, 2002a.

MALATESTA, M.; et al. Ultrastructural morphometrical and immunocytochemical analyses of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soybean. **Cell Structure and Function** v. 27, p. 173-80, 2002b.

MANUAL DA QUALIDADE. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006. 10p. (65.3230.009)

MATSUOKA, T. A. et al. Multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five Lines of genetically modified maize. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**. v. 42; n.1;p. 24-32, 2001.

MATTEDI, J. C. CTNBio aprova nova liberação de milho transgênico para venda no país. **Agência Brasil**. out. 2007. Disponível em: <http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2007/08/16/materia.2007-08-16.6769_437960/view>. Acesso em: 15 jan 2008.

MAZZA, R.; et al. Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. **Transgenic Research**, v. 14, p. 775-84, 2005.

McHUGHEN, A.; SMYTH, S. US regulatory system for genetically modified [genetically modified organism (GMO), rDNA or transgenic] crop cultivars. **Plant Biotechnology Journal**, v.6, n.1, p.2-12, Jan., 2007.

MEDRONHO, R. A., PEREZ, M. A. Testes Diagnósticos. In: MEDRONHO, R. A., et al. **Epidemiologia**. São Paulo, Atheneu, 2006. p. 259-270.

MILLER, J. Genetically modifying plants to have increased tolerance to abiotic stress. **Microbiology and Molecular Genetics Basic Biotechnology eJournal** , v.3, p. 117-122, 2007.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E DA TECNOLOGIA. **Ciência, tecnologia e inovação: qualidade de vida**. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0004/4755.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2008

MIRAGLIA, M.; et al.. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 7, n.42, p. 1157-1180, 2004.

MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.4, p.517-531, 2005.

MONSANTO. **Safety assessment of YieldGard® insect-protected corn event MON810**. 2002. Disponível em: <<http://www.agbios.com/docroot/decdocs/02-269-010.pdf>> Acesso em: 23 ago. 2006.

MOSCHINI, G. C.; LAPAN, H. Labeling regulations and segregation of first- and second-generation genetically modified products: innovation incentives and welfare effects. Apr. 2005. Disponível em: <http://www.card.iastate.edu/faculty/profiles/giancarlo_moschini/moschini-lapan-chapter-just-ook.pdf>. Acesso em: 6 dez. 2007.

NODARI R.O.; GUERRA M. P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **CC&T**, v.18, n.1, p. 81-116, 2001.

NODARI, R.O.; GUERRA, M. P. Plantas Transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar. **Revista de Nutrição**, v.16, n.1, p.105-116, 2003.

OLIVEIRA, E. M. M.; WATANABE, E.; MARIN, V. A. Revisão: segurança alimentar de produtos derivados da biotecnologia moderna. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 2, p. 201-213, 2004.

ONISHI, M., et al. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified maize. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 9713- 9721, 2005.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Biotechnology regulatory developments in OECD member countries**. Paris, 2003. Disponível em : <<http://www.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-document-531-14-no-no-9598-0,00.html>>. Acesso em: 17 fev. 2007.

ORTIZ-GARCIA S. et al. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003–2004). **PNAS**. v. 102, n. 35, 2005. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0503356102>. Acesso em: 17 jan. 2008.

PEREIRA, G. A. **Uso do gene XylA – xilose isomerase como agente de seleção na transformação genética de citros**. Piracicaba: USP, 2004. Dissertação (Mestrados) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PEW INITIATIVE ON FOOD AND BIOTECHNOLOGY. **Harvest on the horizon: future use of agricultural biotechnology**. set., 2001. Disponível em: <[http://www.pewtrusts.org/uploadedFiles/wwwpewtrustsorg/Reports/Food_and_Bio technology/hhs_biotech_harvest_report.pdf](http://www.pewtrusts.org/uploadedFiles/wwwpewtrustsorg/Reports/Food_and_Bio%20technology/hhs_biotech_harvest_report.pdf)>. Acesso em: 16 set. 2007.

POLANCZYK, R.; ALVES ,S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**. V. 7, n.2, p. 1 – 10, 2003.

PONÇANO, V. M. L.; CARVALHO, T. E. M. Rastreabilidade: a chave para a credibilidade em medições químicas. **Metrologia & Instrumentação**, São Paulo, n 41, p. 20-24, abr.-maio, 2006.

QUECINI, V. M.; VIEIRA, M. L. C. Expressão transiente em tecidos intactos de *Stylosanthes guianensis* (AUBL.) SW. via eletroporação. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 4, p.759-765, out.-dez. 2001.

RANG, A.; LINKE, B.; JANSEN, B. Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Roundup Ready soybean. **European Food Research and Technology**, v. 220, p. 438-43, 2005.

REVIEW

RHEE, G. S.; et al. Multigeneration reproductive and developmental toxicity study of *bar* gene inserted into genetically modified potato on rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 68, p. 2263-76, 2005.

ROHILA, J. S.; JAIN, R. K.; WUA, R. Genetic improvement of Basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley Hva1 cDNA. **Plant Science**, v. 163, p. 525-532, 2002.

SANFORD, J. C. et al. Delivery of substance into cells tissues using a particle bombardment process. **Particle Science Technology**, Philadelphia, v.5, p.27-37, 1987.

SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 206-209, 1990.

SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSEL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzimology**, v.217, p.483-510, 1993.

SANHOTY, R. E. et al. Genetically modified maize and soybean on the Egyptian food market. **Nahrung/Food**. v. 46, n. 5 , p. 360 – 363, 2002.

SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas **Revista de Ciência & Tecnologia**, v. 15, p. 81-90, jun., 2000 a.

SANTARÉM, E. R. SAAT: Transformação de plantas mediada por ultrason e *Agrobacterium*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p.725-730. 2000 b.

SCANDIZZO, S. International trade and the labelling of Genetically Modified Organisms. **Briefing Notes in Economics**, n. 54, sep-oct., 2002. Disponível em: <<http://www.richmond.ac.uk/bne>>. Acesso em: 22 set. 2007.

SCHULTEN, S. M., et al.. Validation of microbiological methods. In: FREITAS, E. I.; LEMOS A. A.; MARIN, V. A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.11, n. 4, p.1073-1083, 2006.

SHEHATA, M.M. Genetically modified organisms (GMOs), food and feed: Current status and detection. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 43-55, 2005.

SILVA, M. A.; CARLIN, S. D.; CAPUTO, M. M. Tipos de colheita e épocas de aplicação de glifosato na erradicação de soqueiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n.1, p.43-49, jan., 2006.

SILVA, V.; AMARAL, A. M. P. Segurança alimentar, comércio internacional e segurança sanitária. **Informações Econômicas**, v.34, n.6, p. 38-45, jun., 2004.

STACKEBRANDT, E., et al. Designation of Streptomyces 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, p.1468–1477, 1991.

STEWART, P. A.; McLEAN, W. Fear and hope over the third generation of agricultural biotechnology: analysis of public response in the Federal Register. **AgBioForum**, v. 7, n.3, p. 133-141, 2004.

TAO, Z., et al. Detection of exogenous genes in genetically modified plants with Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 289–298, Dec., 2001.

TENGEL, C., et al. PCR-Based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs **BioTechniques**. v. 31, p. 426-429, 2001.

THUSWOHL, M. Ibama e Anvisa pedem anulação da liberação de milho transgênico. IDEC. Jul. 2007. Disponível em: <<http://www.idec.org.br/noticia.asp?id=8426>>. Acesso em: 17 jan. 2008.

VECCHIO, L.; et al. Ultrastructural analysis of testes from mice fed on genetically modified soybean. **European Journal of Histochemistry**, v. 48, n. 4, p. 449-54, 2004.

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