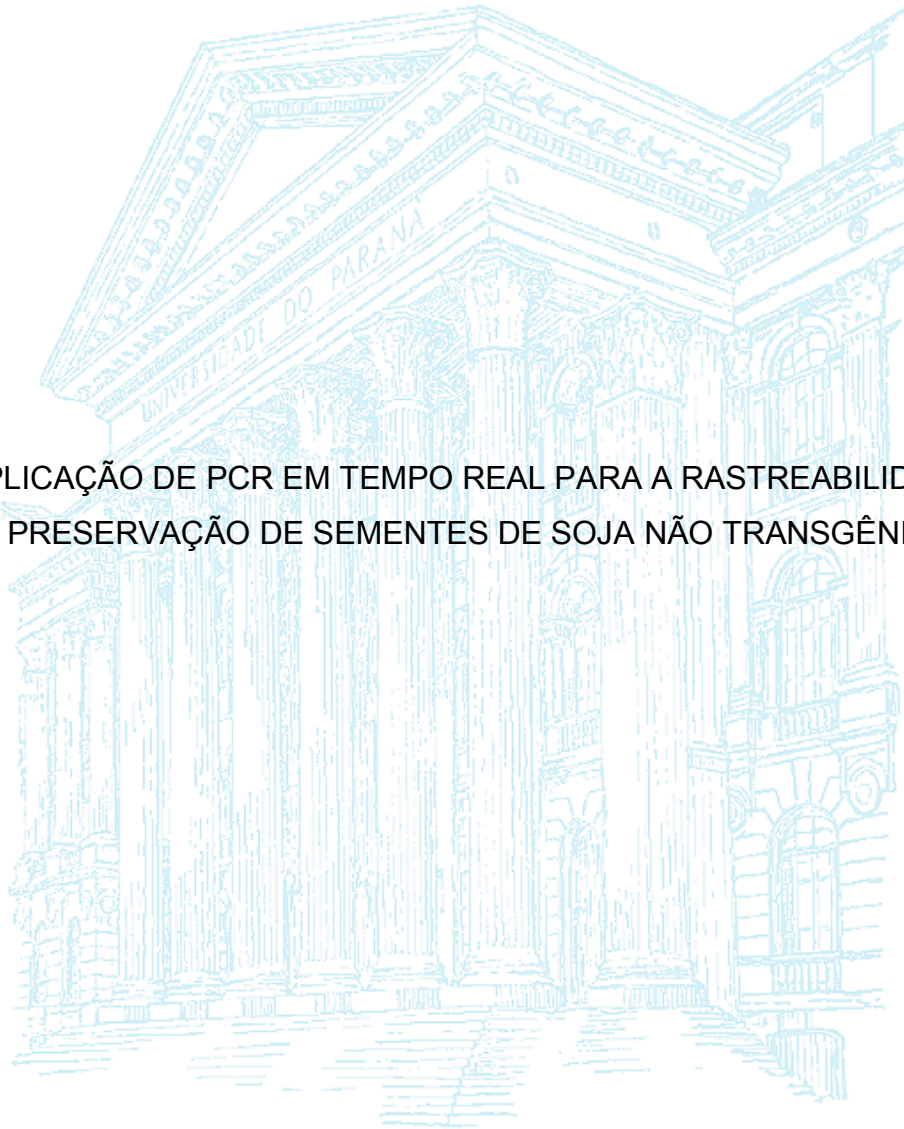


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOELMA NILZA DOS SANTOS LEÃO

APLICAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA A RASTREABILIDADE E
PRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA NÃO TRANSGÊNICA.



CURITIBA
2013

JOELMA NILZA DOS SANTOS LEÃO

APLICAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA A RASTREABILIDADE E
PRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA NÃO TRANSGÊNICA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração em Saúde Humana e Animal, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA
2013



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Universidade Federal do Paraná
Setor de Tecnologia
Curso de Doutorado em Processos
Biotecnológicos

Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro de 2013, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, segundo andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Septuagésima Segunda Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Profª Drª Leila Teresinha Maranhão (UFPR), Profª Drª Michele Rigon Spier (UFPR), Drª Silvana Maria Alban (UFPR) e Profª Drª Vanete Thomaz Soccol (UFPR - orientadora da dissertação).


Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Joelma Nilza dos Santos Leão** a fazer a apresentação da Dissertação intitulada: **"Aplicação de PCR em tempo real para a rastreabilidade e preservação de sementes de soja não transgênica"**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.


Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Profª Drª Leila Teresinha Maranhão, Profª Drª Michele Rigon Spier, Drª Silvana Maria Alban e Profª Drª Vanete Thomaz Soccol declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 25 de Fevereiro de 2013.


Profª Drª Leila Teresinha Maranhão


Profª Drª Michele Rigon Spier


Drª Silvana Maria Alban


Profª Drª Vanete Thomaz Soccol

"Querido esposo, Luís Miguel.
Pais, Fernando (*in memoriam*) e Maria Emília.
Irmãos, Paulo, Gildo e Fernanda.
A vós dedico".

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades e bençãos concedidas.

À minha família, em especial aos meus avós Malote (*in memoriam*) e Amélia, pelos ensinamentos e apoio prestado ao longo da vida.

À Prof^a. Dr^a. Vanete Thomaz Soccol, pela orientação, confiança e pelas lições, não só relacionadas à ciência, mas também de vida.

À Silvana Alban, Jossimara Poletini e Maria Carolina Vieira da Rocha, pelo apoio prestado na execução prática do presente trabalho.

Ao Laboratório de Engenharia Ambiental (LABEAM) Prof. Francisco Borsari Netto do Departamento de Hidráulica e Saneamento, pela disponibilização do equipamento PCR em tempo real.

Ao Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane, em especial ao Prof. Dr. Luís Carlos Bernardo Gil das Neves e à Dra. Dácia Alzira de Augusto Correia, pelo incentivo na formação de seus quadros.

À Fundação Rita Levi Montalcinni, representada pelo Prof. Dr. Mauro Colombo, pelo apoio financeiro.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, representada pelo Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol e Prof^a. Dr^a. Luciana Porto Souza Vandenberghe, pela oportunidade concedida no ingresso ao Programa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, Cristóvão Fernandes, Miriam Mine, Maria Cristina Braga, Sérgio Braga, José Ota, Miguel Aisse, Marcelo Bessa e Regina Kishi, pelo apoio incondicional.

À Renata de Abreu e Ludmilla Troiano, pela amizade e carinho.

Aos colegas do Programa: Allan Panisson, Rafaela Fogaça, Paulo Urbano, Camila Pereira, Déric Rocumback, Denise Kitamura, Maria Rosa Prado e Michelle Tanoue, pelo companheirismo e fortalecimento.

Aos colegas de laboratório, Ricardo Fendrich e Juliana Seger, pela convivência.

À Prof^a. Dr^a. Michele Rigon Spier, pelo encorajamento e força.

À Jussara do Rego Elias e Luiz Carlos Barbosa, pela pronta disposição.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

"Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem concentração e autosacrifício,
esforço e dúvida."

Max Beerbohm

RESUMO

A presença crescente de culturas e produtos alimentares derivados de plantas geneticamente modificadas tem levado ao desenvolvimento de métodos de detecção capazes de distinguir entre alimentos derivados da biotecnologia e alimentos convencionais. A técnica de PCR convencional têm sido utilizada para detectar organismos geneticamente modificados (OGM) em matéria prima e em alimentos altamente processados. Porém, esta técnica não fornece informação quantitativa do OGM presente no alimento. O sucesso da metodologia está relacionada a fatores como amostragem, o grau de processamento das amostras e a eficiência do método de extração de DNA. Existindo no Brasil, o Decreto n° 4.680/2003, que regulamenta a rotulagem obrigatória de alimentos que contenham acima de 1% de OGM em sua composição, torna-se necessário o uso de um método quantitativo para o controle dos limites exigidos. O presente trabalho teve como objetivos avaliar o método CTAB na extração de DNA de sementes e grãos de soja contaminados com quantidades diferentes de sementes de soja RR[®], detectar por PCR e quantificar por PCR em tempo real o teor de transgenia em sementes e grãos de soja contaminados com diferentes quantidades de soja transgênica; avaliar a técnica de PCR em tempo real usando dois kits. Os resultados mostraram que o método CTAB foi eficiente na extração DNA das amostras. Os genes endógeno da soja e o RR[®] apresentaram bandas esperadas pela amplificação por PCR convencional. A PCR em tempo real detectou duas sementes GM em 500g de sementes de soja convencional e apenas uma semente GM em 100g de grãos de soja convencional. A metodologia utilizando os dois fluoróforos mostrou-se confiável na detecção de soja RR[®], com nível de sensibilidade similar, uma vez que os resultados obtidos de Ct revelaram valores próximos. Porém, apesar de ser menos específico que o *kit Mericon Assay*, o sistema SYBR Green foi capaz de detectar presença de OGM ao mesmo nível de sensibilidade do *kit Mericon Assay*, demonstrando ser de eleição na rotina de laboratório e para trabalhos de prestação de serviços. Este método irá possibilitar a detecção de sementes transgênicas em lotes de semente convencional, permitirá aos produtores selecionar e preservar variedades de soja não transgênica. A técnica também possibilitará a detecção e quantificação de soja geneticamente modificada aprovada no Brasil e facultará as autoridades competentes ferramentas para o rastreio, identificação e controle de outros organismos geneticamente modificados que possam estar presentes em produtos alimentares comercializados no mercado Brasileiro, de modo a assegurar o cumprimento da lei existente.

Palavras-chave: Soja Roundup Ready[®], OGM, PCR, PCR em tempo real.

ABSTRACT

The increase presence of crops and food products derived from genetically modified organisms (GMO) has led to the development of detection methods that distinguish between foods derived from biotechnology and conventional foods. The conventional PCR technique has been used to detect GMO in raw material and highly processed foods. However, this technique does not provide quantitative information of genetically modified organisms present in the food. The success of the methodology is related to factors such as sampling, the degree of sample processing and efficiency of DNA extraction method. Existing in Brazil Decree n° 4.680/2003, wich regulates the mandatory labeling of food containing more than 1% of GMO in its composition, it becomes necessary to use a quantitative method to control que required limits. The present study aimed to evaluate the CTAB method for DNA extraction from seeds and soybeans contaminated with different amounts of RR[®] soybean seeds, detect by PCR and quantification by real-time PCR of transgenic in soybean seeds and grains contaminated with varying amounts of GM soy; evaluate the technique of real-time PCR using two fluorophores. The results showed that CTAB method was efficient in DNA extraction of samples. The endogenous gene and RR[®] exhibited expected bands by conventional PCR amplification. The real-time PCR detected two GM seeds in 500g of conventional soybean seeds and only one GM seed in 100g of conventional soybean grains. The methodology using two fluorophores proved to be reliable in the detection of RR[®] soybean, with similar sensibility level, since the results obtained Ct values showed close. However, despite being less specific than Mericon Assay kit, SYBR Green system was able to detect the presence of GMO at the same level of sensitivity Mericon Assay kit, demonstrating to be of election in routine laboratory work and service. This method will enable the detection of genetically modified seeds in conventional seed lots and allow producers to select and preserv non.GM soybean varieties. The technique will also enable the detection and quantification of GM soybean approved in Brazil and provide the authorities with tools of screening, identification and control of other GMO that may be present in food products sold in the Brazilian market, to ensure the compliance with existing law.

Key-words: Roundup Ready[®] soybean, GMO, PCR, Real Time PCR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MELHORAMENTO CONVENCIONAL VERSUS BIOTECNOLOGIA MODERNA	22
FIGURA 2 - ETAPAS DA TRANSFORMAÇÃO: IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE, ISOLAMENTO, CLONAGEM, TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO	24
FIGURA 3 - TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS POR <i>AGROBACTERIUM</i>	25
FIGURA 4 - TRANSFORMAÇÃO POR BOMBARDEAMENTO DE MICROPARTÍCULAS	26
FIGURA 5 - MECANISMO DE AÇÃO DO GLIFOSATO	28
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA CONSTRUÇÃO PRESENTE NA SOJA <i>ROUNDUP READY</i> [®]	29
FIGURA 7 - ÁREA GLOBAL DE CULTURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS.....	31
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DA PCR	45
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FASES DA PCR EM TEMPO REAL	49
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DA REAÇÃO DO CORANTE INTERCALANTE <i>SYBR GREEN</i>	51
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DA SONDA <i>TaqMan</i>	53
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DA SONDA <i>FRET</i>	54
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DA SONDA <i>SCORPION</i>	55
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DA SONDA <i>MOLECULAR BEACONS</i>	56
FIGURA 15 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (0,8%) DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DA SOJA EM TRIPLICATA, PELO MÉTODO CTAB.....	67
FIGURA 16 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA - GENE DA LECITINA COM O PAR DE <i>PRIMER</i> GMO3/GMO4	70
FIGURA 17 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE GRÃOS DE SOJA - GENE DA LECITINA COM O PAR DE <i>PRIMER</i> GMO3/GMO4	71
FIGURA 18 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA – GENE RR COM O PAR DE <i>PRIMER</i> p35S-f2/petu-r1.....	73
FIGURA 19 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE GRÃOS DE SOJA - GENE RR COM O PAR DE <i>PRIMER</i> p35S-f2/petu-r1	73
FIGURA 20 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE LECITINA EM SEMENTES DE SOJA PELO <i>KIT MERICON ASSAY</i>	77
FIGURA 21 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE LECITINA EM GRÃOS DE SOJA PELO <i>KIT MERICON ASSAY</i>	77
FIGURA 22 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE RR [®] EM SEMENTES DE SOJA PELO <i>KIT MERICON ASSAY</i>	78
FIGURA 23 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE RR [®] EM GRÃOS DE SOJA PELO <i>KIT MERICON ASSAY</i>	79
FIGURA 24 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE LECITINA EM SEMENTES DE SOJA PELO <i>KIT SYBR GREEN</i>	80

FIGURA 25 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE LECITINA EM GRÃOS DE SOJA PELO <i>KIT SYBR GREEN</i>	80
FIGURA 26 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE RR [®] EM SEMENTES DE SOJA PELO <i>KIT SYBR GREEN</i>	81
FIGURA 27 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE RR [®] EM GRÃOS DE SOJA PELO <i>KIT SYBR GREEN</i>	81

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ÁREA (MILHÕES DE ha) PLANTADA COM AS PRINCIPAIS CULTURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS NO MUNDO	31
---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS AUTORIZADAS PARA PRODUÇÃO COMERCIAL NO BRASIL	33
QUADRO 2 - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DOS PRINCIPAIS MÉTODOS USADOS NA DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OGMs EM ALIMENTOS	39
QUADRO 3 – CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DAS SEMENTES DE SOJA.....	58
QUADRO 4 – CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DOS GRÃOS DE SOJA	58
QUADRO 5 – SEQUÊNCIA DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR QUALITATIVO	61
QUADRO 6 – DADOS DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO DO DNA DAS SEMENTES DE SOJA	65
QUADRO 7 – DADOS DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO DO DNA DOS GRÃOS DE SOJA	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - REGULAMENTO DE ROTULAGEM DE OGM EM ALIMENTOS EM DIFERENTES PAÍSES E OS LIMITES PERMITIDOS.....	36
TABELA 2 - DADOS DE Ct E NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES DA LECITINA E RR, OBTIDOS DAS SEMENTES DE SOJA POR PCR EM TEMPO REAL	75
TABELA 3 - DADOS DE Ct E NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES DA LECITINA E RR, OBTIDOS DOS GRÃOS DE SOJA POR PCR EM TEMPO REAL	75
TABELA 5 - PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS NA QUANTIFICAÇÃO DE OGMs PELO KIT MERICON ASSAY.....	83
TABELA 6 - QUANTIFICAÇÃO DE OGMs PELO KIT MERICON ASSAY	83

LISTA DE SIGLAS

Ac – Anticorpo

Ag – Antígeno

CaMV – Vírus do Mosaico da Couve-flor

Ct – *Threshold cycle*

CTAB – Brometo de hexadecil-trimetil-amônio

CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP(s) – Desoxirribonucleotídeo(s) trifosfato

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EPSPS - 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

FRET – *Fuorescence Resonance Energy Transfer*

ISAAA – Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agribiotecnologia

GM – Geneticamente Modificado

N/A – Não aplicável

PCB – Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-QC – PCR quantitativa competitiva

PCR-TR – PCR em tempo real

OGM – Organismo Geneticamente Modificado

Ri – *Root-inducing*

RR[®] – *Roundup Ready*[®]

RRS – *Roundup Ready Soybean*

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TFL – Teste de Fluxo Lateral

Ti – *Tumor-inducing*

UE – União Européia

UV – Ultra Violeta

VIC – 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein

LISTA DE ABREVIATURAS

art. – artigo

d – dias

h – horas

min. – minutos

n° – número

sp. – espécie

LISTA DE SÍMBOLOS

° C – grau Celsius

g – grama

ha – hectares

® – marca registrada

μ – micro

mL – mililitro

M – molar

% – percentagem

V – volts

x g – vezes a Aceleração da Gravidade

ΔRN – fluorescência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 GERAL	20
2.2 ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 HISTÓRICO	21
3.2 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS	22
3.3 SOJA <i>ROUNDUP READY</i> [®] (RRS)	27
3.4 EVOLUÇÃO DO CULTIVO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS NO MUNDO.....	30
3.4.1 Cultivo de plantas geneticamente modificadas no Brasil	31
3.5 LEGISLAÇÃO DE ALIMENTOS CONTENDO ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS	34
3.6 EXTRAÇÃO DE DNA	37
3.7 DETECÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS.....	38
3.7.1 Detecção de OGM com base na presença de proteínas	40
3.7.1.1 Imunoensaio.....	40
3.7.1.1.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	40
3.7.1.1.2 Western blot	41
3.7.1.2. Imunocromatográfico	42
3.7.1.2.1 Tira de fluxo lateral (TFL)	42
3.7.2 Detecção de OGM com base na presença de DNA.....	43
3.7.2.1 <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR).....	43
3.8 QUANTIFICAÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS.....	46
3.8.1 PCR quantitativa competitiva.....	46
3.8.2 PCR em tempo real.....	47
3.8.2.1 <i>SYBR Green</i>	50
3.8.2.2 Sondas <i>TaqMan</i>	52
3.8.2.3 Sondas <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> (FRET).....	54
3.8.2.4 Sondas <i>Scorpions</i>	55
3.8.2.5 Sondas <i>Molecular beacons</i>	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	57

4.1 AMOSTRAS.....	57
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	57
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA	59
4.3.1 <i>Cetyl trimethylammonium bromide</i> (CTAB)	59
4.4 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DO DNA	60
4.5 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR.....	60
4.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	61
4.7 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 EXTRAÇÃO DE DNA	64
5.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR.....	70
5.2.1 Amplificação do gene específico da soja (lecitina)	70
5.2.2 Amplificação do gene transgênico (<i>Roundup Ready Soybean</i> ®)	72
5.3 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL	74
5.3.1 Avaliação da sensibilidade e especificidade por PCR em tempo real pelo <i>kit Mericon Assay</i>	76
5.3.2 Avaliação da sensibilidade e especificidade por PCR em tempo real pelo kit SYBR Green	79
6 CONCLUSÕES	85
PERSPECTIVAS FUTURAS	87
REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia agrícola trouxe grandes conquistas para a humanidade com o desenvolvimento de plantas para produção de alimento humano, ração animal e outros produtos.

Desde a introdução comercial do primeiro produto geneticamente modificado (o tomate *Flavr Savr*, de amadurecimento tardio) pelos Estados Unidos da América (EUA) em 1994, poucos anos se passaram para que culturas transgênicas aumentassem rapidamente. Passou de 1,7 milhões de hectares em seis países em 1996 para 160 milhões de hectares em 29 países em 2009, ou seja, apresentou um aumento para mais de 94 vezes em todo o mundo (ANKLAM *et al.*, 2002; GREINER *et al.*, 2005a; YANG *et al.*, 2007; ADUGNA & MESFIN 2008; TAKABATAKE *et al.*, 2010, LI *et al.*, 2011; JAMES 2011).

Se a agricultura tradicional permitiu à humanidade independência e aumento populacional, a utilização da engenharia genética resultou num número crescente de variedades de culturas. Vale ressaltar que o milho e a soja são as culturas geneticamente modificadas mais cultivadas no mundo e representam o principal constituinte de vários alimentos (GACHET *et al.*, 1999; AERNI, 2005).

A adição de genes exógenos tem sido frequentemente utilizada em plantas, permitindo a transformação de plantas convencionais em plantas com melhor qualidade e mais produtividade. Estas mudanças permitem as mesmas serem resistentes à pragas, tolerantes a condições ambientais adversas e produzirem variedades nutricionalmente enriquecidas (DEISINGH & BADRIE 2005; JAMES, 2011).

A principal característica inserida nas culturas é a que confere tolerância a determinados herbicidas (UJHELYI *et al.*, 2008). O primeiro sucesso mundial de cultura tolerante aos herbicidas foi obtido com a soja, através do gene que confere insensibilidade à enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS). Este gene é denominado CP4 e provém da bactéria do solo do gênero *Agrobacterium* (BERDAL & HOST-JENSEN, 2001).

Em meados dos anos 90, começaram a ser comercializados alimentos obtidos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM), derivados principalmente de variedades de soja tolerante ao herbicida *Roundup (Roundup-Ready)* e de milho

(denominado Bt 176) resistente a uma importante praga das lavouras, a lagarta. Inicialmente, a resistência de muitos consumidores a estes alimentos, resultou em restrições ao consumo e introdução de barreiras para comercialização de produtos derivados de OGM (ABDULLAH *et al.*, 2006).

Com o estabelecimento de legislação específica (CANKAR *et al.*, 2006), que pode variar conforme o país ou bloco de países, foi imposta a rotulagem de produtos que contém ou que são produzidos a partir de OGM. Estas restrições visam o controle de possível impacto dos mesmos na saúde pública e no meio ambiente e proporcionar ao consumidor o poder de escolha sobre os produtos que consome (CHEN *et al.*, 2005; TUNG NGUYEN *et al.*, 2008a; NIKOLIC *et al.*, 2009).

Nos países da União Europeia (UE), a produção de OGM, sua liberação no meio ambiente, rotulagem e a comercialização de produtos alimentares derivados de OGM são estritamente reguladas (HUGGETT & CONZELMANN, 1997; ANKLAM *et al.*, 2002). Para a colocação no mercado de tais produtos, a lei estabelece o limite obrigatório de rotulagem de 0,9% para OGM autorizados na UE (EUROPEAN UNION, 2000; ROTT *et al.*, 2004; GARCIA, 2006; QUERCY *et al.*, 2006; ALEXANDER *et al.*, 2007; STOBIECKA *et al.*, 2007; TASKI-AJDUKOVIC *et al.*, 2009; BRANQUINHO *et al.*, 2010; SCHOLTENS *et al.*, 2010).

No Brasil, para a comercialização de alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal, que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM, acima do limite de 1%, o consumidor deverá ser informado quanto à natureza transgênica desse produto (BRASIL, 2003; FERREIRA *et al.*, 2009; BRANQUINHO *et al.*, 2010; DINON *et al.*, 2010).

A semente de soja modificada geneticamente não apresenta diferenças morfológicas das variedades convencionais, sendo impossível a sua distinção macroscópica. Para a sua diferenciação, há necessidade de disposição de métodos sensíveis de detecção e quantificação de traços de transgênicos em sementes e em alimentos processados, de modo a assegurar o cumprimento da legislação de rotulagem obrigatória existente no país (Brasil). Outro aspecto relevante é a preservação de sementes não transgênicas para permitir a produtores ou países que não queiram aderir à plantação de soja GM que possam ter o poder de escolha.

Para detectar a presença de OGM em matéria-prima ou em produtos processados, são necessários métodos analíticos. A reação da polimerização em cadeia (PCR) é o método mais comumente aplicado, sendo altamente sensível e

específico para a amplificação de DNA (KAKIHARA *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006; SHIMIZU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2011). Entretanto, a PCR convencional não fornece informação quantitativa, e, existindo no Brasil e em vários outros países o regulamento relativo a rotulagem de alimentos geneticamente modificados e ao limite de OGM num determinado produto alimentar, torna-se necessário o uso de um método quantitativo para o controle dos limites exigidos (HEID *et al.*, 1996).

Assim, devido a rapidez, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, a PCR em Tempo Real é considerada atualmente, a ferramenta mais potente para a detecção e quantificação de OGM em alimentos (HEID *et al.*, 1996; OLIVEIRA, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral a detecção e quantificação de soja transgênica em sementes e grãos de soja pelo método PCR em Tempo Real.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a extração de DNA das amostras de sementes e grãos de soja pelo método Brometo de hexadecil-trimetil-amônio (CTAB);
- Detectar qualitativamente a presença de transgenia em sementes e grãos de soja, contaminados com diferentes quantidades de soja transgênica por PCR convencional;
- Padronizar o método de PCR em tempo real para disponibilizar a produtores permitindo aos mesmos uma nova opção para selecionar variedades de soja não transgênica.
- Detectar quantitativamente a presença de transgenia em sementes e grãos de soja, contaminados com diferentes quantidades de soja transgênica, visando determinar a sensibilidade da técnica;
- Comparar o nível de sensibilidade da metodologia usando dois fluoróforos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO

A biotecnologia teve seu início com os processos fermentativos e as primeiras aplicações biotecnológicas datam de meados de 1800 a.C., com o uso de leveduras para fermentar vinho, cerveja e pães. Desde então várias aplicações da biotecnologia foram implementadas (ALVES, 2004). Na história mais recente, um dos processos biotecnológicos mais conhecidos é a técnica de pasteurização. Em 1860, Louis Pasteur estabeleceu a ciência da microbiologia, desenvolvendo a técnica da pasteurização para eliminar contaminação por microrganismos. Quarenta anos depois as Leis de Mendel foram redescobertas e começaram a ser aplicadas. Em 1922, produtores americanos utilizaram pela primeira vez o milho híbrido, e a partir de 1928, com a descoberta da penicilina por Alexandre Fleming, diversos tipos de antibióticos foram desenvolvidos no mundo, marcando a indústria da fermentação (XAVIER *et al.*, 2009).

Durante 90 anos, o estudo da genética teve seus avanços baseados nas teorias de Mendel e a genética mendeliana contribuiu para a sustentação do crescimento populacional, produzindo maiores safras de alimentos de origem vegetal, aumentando a produtividade de animais e contribuindo para uma maior longevidade humana (VISBRASIL, 2012).

Outra pedra fundamental da biotecnologia foi a descoberta da estrutura do ácido desoxirribonucléico (DNA). Na década de 50, Watson, Crick e Wilkins revelaram a estrutura do DNA, dando novas ferramentas para o estudo e desenvolvimento da genética. Porém, o crescimento acelerado no campo da biotecnologia ocorreu a partir da década de 70, com o desenvolvimento da engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante (XAVIER *et al.*, 2009).

De acordo com GUERRANTE (2011), até a década de 70, para melhorar as características qualitativas e/ou quantitativas de um vegetal, era realizado o melhoramento convencional, ou seja, a variedade a ser melhorada era cruzada com a variedade portadora das características de interesse, seguido de outros cruzamentos para a seleção da característica desejada, etapas estas que poderiam levar longos

períodos. A engenharia genética trouxe inovação no processo e redução de tempo na obtenção das características desejadas, de forma mais precisa, rápida e eficiente (FIGURA 1).

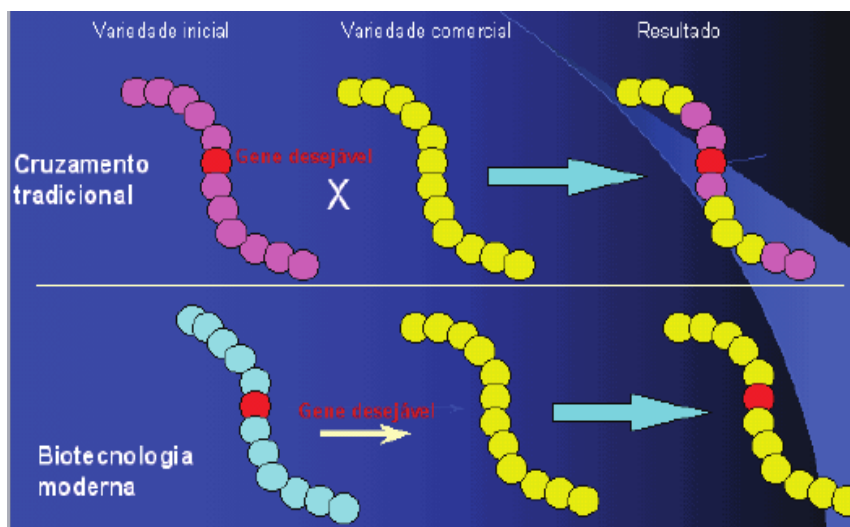


FIGURA 1 - MELHORAMENTO CONVENCIONAL VERSUS BIOTECNOLOGIA MODERNA
 FONTE: GUERRANTE (2011)

Com a decodificação do código genético e a manipulação do DNA, as descobertas científicas e suas aplicações biotecnológicas aceleram, dando possibilidade para novas perspectivas nos campos da saúde humana, sanidade animal, produção de alimentos, bem como em outras indústrias, com a criação de organismos geneticamente modificados (BARROS *et al.*, 2008).

3.2 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Um dos resultados surpreendentes da biologia moderna foi a capacidade de criar Organismos Geneticamente Modificados (OGM), que são organismos vivos, cujo material genético foi alterado por meio de engenharia genética (MEYER *et al.*, 1996; ANKLAM *et al.*, 2002, DE ANDRADE, 2003; PETIT *et al.*, 2003; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006). A modificação genética envolve a inserção de um fragmento de DNA (o inserto) no genoma do organismo a ser modificado, num processo designado de transformação (GACHET *et al.*, 1999; HOLST-JENSEN, 2001; AHMED, 2002, VILJOEN *et al.*, 2006b).

Um inserto típico para OGM é composto por três elementos básicos: o promotor, que regula a expressão do gene (transcrição) no organismo; a região codificadora, que codifica a proteína de interesse e a região terminadora, que determina o final do processo de transcrição do gene. Além destes, pode ser usado um gene marcador, como resistência a antibiótico ou a herbicidas, que serve para selecionar as células que de fato foram transformadas (DE ANDRADE, 2003; MARCELINO *et al.*, 2003; MARKOULATOS *et al.*, 2004; VILJOEN, 2005a; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006). Estes elementos, juntos, formam uma construção gênica característica de OGM, que é inserida no vetor a ser transformado, por meio de métodos de transformação biológica ou física (AHMED, 2002).

A escolha do método de transformação depende de vários fatores como, a espécie a ser transformada, o tipo de explante utilizado, a capacidade de regeneração do explante, entre outros (FIGURA 2) (DE ANDRADE, 2003).

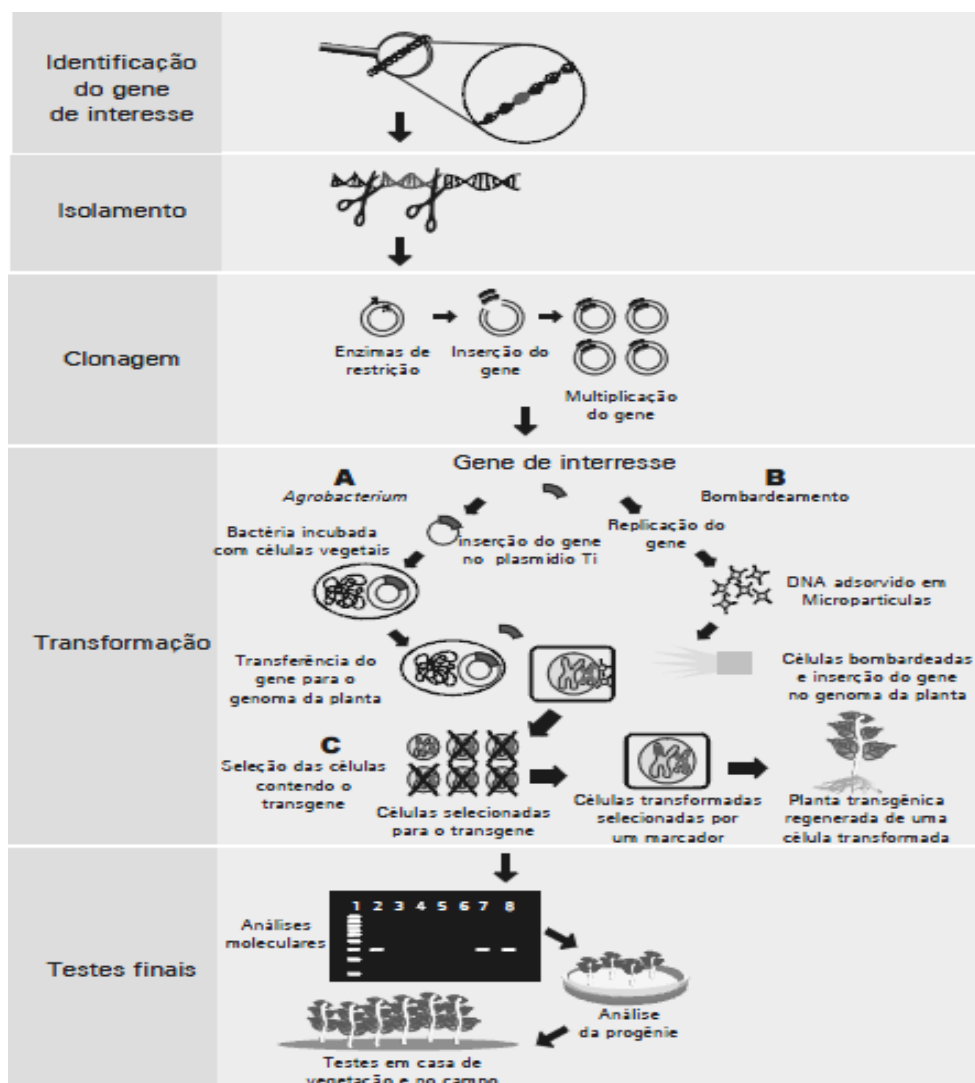


FIGURA 2 - ETAPAS DA TRANSFORMAÇÃO: IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE, ISOLAMENTO, CLONAGEM, TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E AVALIAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO
 FONTE: DE ANDRADE (2003)

A transformação biológica mais utilizada em plantas, é a transformação indireta via *Agrobacterium* (FIGURA 3), que são bactérias fitopatogênicas do solo, capazes de transferir naturalmente material genético para inúmeras espécies de dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas (SANTARÉM, 2000; BARROS *et al.*, 2004). As duas espécies mais utilizadas para transformação genética são a *A. rhizogenes* e a *A. tumefaciens*, devido a susceptibilidade das plantas à infecção (CHILTON *et al.*, 1977; SANTARÉM, 2000; DE ANDRADE, 2003).

De acordo com DE ANDRADE (2003), essas bactérias induzem a formação de um tumor (galha-da-coroa) na planta, pela transferência natural de genes da bactéria que são incorporados no genoma nuclear da planta hospedeira. O processo de formação do tumor ocorre após a liberação pela planta de compostos fenólicos,

açúcares e aminoácidos, levando à infecção pela *Agrobacterium* e a transferência tem início. O fragmento de DNA transferido é denominado de DNA de transferência (T-DNA), que se localiza no plasmídeo bacteriano Ti (*tumor-inducing*), para o caso de bactérias da espécie *A. tumefaciens* e, Ri (*root-inducing*), para espécie *A. rhizogenes*, sendo o plasmídeo Ti o mais efetivo pois abrange maior número de espécies hospedeiras (BARROS *et al.*, 2004).

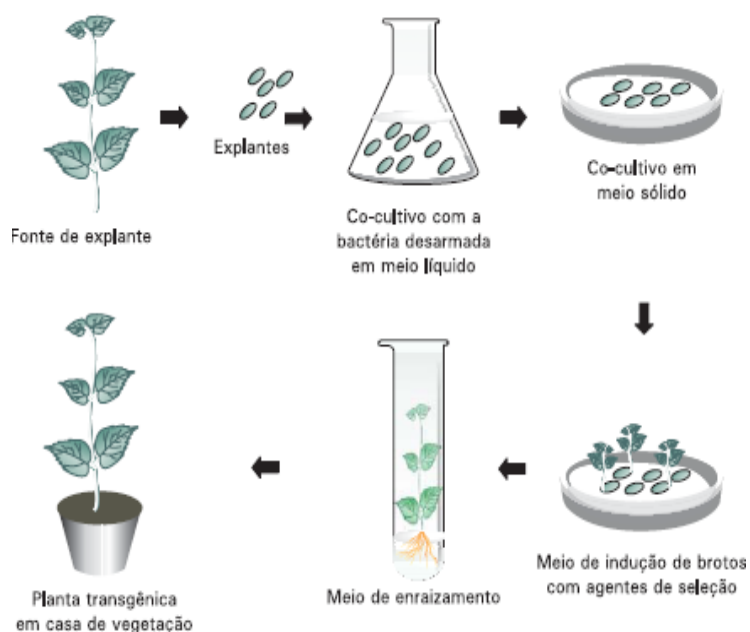


FIGURA 3 - TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS POR *AGROBACTERIUM*
 FONTE: DE ANDRADE (2003)

Segundo SANTARÉM (2000), a técnica é simples e eficiente, porém, possui limitações como, a baixa susceptibilidade da maioria das espécies monocotiledôneas à infecção pela bactéria e a capacidade de regeneração do tecido transformado.

Entre os processos físicos de transformação direta, o mais empregado é a biobalística ou bombardeamento com micropartículas (FIGURA 4), que consiste no bombardeamento de células ou tecidos com micropartículas de ouro ou tungstênio, carregando sequências de ácidos nucléicos exógeno (DE ANDRADE, 2003). As micropartículas são aceleradas usando pólvora seca, gás hélio ou descarga elétrica em alta velocidade contra as células a serem alteradas. Elas penetram na célula de maneira não letal, incorporando-se de forma aleatória nas organelas celulares. Na célula, o DNA é dissociado das micropartículas através da ação do líquido celular e ocorre o processo de integração do gene exógeno no genoma do organismo a ser

modificado. Apesar de ser uma técnica rápida e simples, tem a desvantagem de necessitar de equipamento especial (HARRIER & MILLAM, 2001).

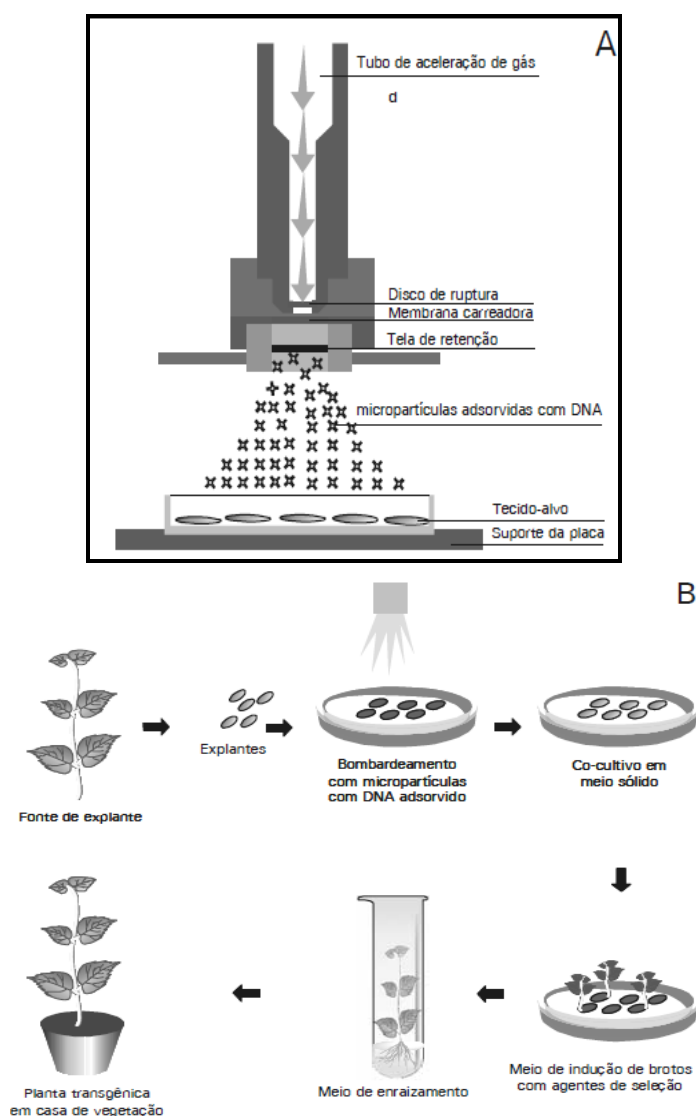


FIGURA 4 - TRANSFORMAÇÃO POR BOMBARDEAMENTO DE MICROPARTÍCULAS
 A: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO DISPOSITIVO DE BOMBARDEAMENTO
 B: TRANSFORMAÇÃO POR BOMBARDEAMENTO
 FONTE: DE ANDRADE (2003)

Além dos métodos de transformação genética descritos anteriormente, existem outros métodos como, a eletroporação, a microinjeção, a transformação de pólen e a utilização de lipossomos que, a partir deles, podem se obter produtos geneticamente modificados, com o objetivo básico de melhorar algumas características (DE ANDRADE, 2003)

Este melhoramento pode ter como finalidade maior produção, obter um produto com características de resistência a doenças, a fitofármacos ou a condições adversas

(PADGETTE *et al.*, 1996; CARDARELLI *et al.*, 2005; UJHELYI *et al.*, 2008; TUNG NGUYEN *et al.*, 2009b). Como exemplos destas situações destacam-se: batateiras transgênicas que produzem maior quantidade de amido nos seus tubérculos; trigo cujo grão fornece farinha com gluteninas melhor adaptadas para panificação; arroz dourado, que produz beta caroteno; tomate com amadurecimento retardado, por diminuição da síntese da enzima poligalacturonase, responsável pelo amolecimento de paredes celulares; milho, algodão e soja Bt, ou seja, plantas transgênicas que incorporam genes do *Bacillus thuringiensis* (Bt), produzindo uma toxina que mata as larvas de insetos que causam graves danos a estas plantas; tomateiros com genes da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, tolerantes ao herbicida *Roundup* (OLIVEIRA, 1999).

Assim, uma planta ou um produto GM pode ser distinguido do seu tipo selvagem equivalente, a partir do teste para a presença do DNA introduzido (AHMED, 2002; MARCELINO *et al.*, 2003).

3.3 SOJA *ROUNDUP READY*[®] (RRS)

As ferramentas recentemente disponibilizadas em biotecnologia promoveram um incremento do escopo de produtos a serem gerados. A quebra das barreiras reprodutivas, permitindo a troca de genes entre espécies distintas, possibilitou o desenvolvimento de novos produtos com qualidades e características nunca antes alcançadas seguindo os métodos tradicionais (ARIAS, 2004).

As características inseridas mais comuns são a tolerância a herbicidas, resistência a insetos e a combinação das duas características (VILJOEN, 2005a; YANG *et al.*, 2007). Porém, a principal característica inserida nas culturas é a que confere tolerância a determinados herbicidas (BERDAL & HOLST-JENSEN, 2001; UJHELYI *et al.*, 2008). Destaca-se que o primeiro sucesso mundial de cultura tolerante aos herbicidas foi obtido com a soja (BERDAL & HOST-JENSEN, 2001; DILL, 2005).

A soja *Roundup Ready*[®] é a principal cultura transgênica (GREINER & KONIETZNY, 2008b; UJHELYI *et al.*, 2008; TASKI-AJDUKOVIC *et al.*, 2009; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2012). Foi desenvolvida pela Monsanto (GUSTAFSON, 2008; DUIJN *et al.*, 2009) com o objetivo de permitir o uso de glifosato

no controle efetivo de ervas daninhas na produção de soja (PADGETTE *et al.*, 1996; QUERCY *et al.*, 2006; BERVALD *et al.*, 2010).

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina, $C_3H_8NO_5P$], ingrediente ativo do *Roundup*[®], é um herbicida sistêmico, de amplo espectro, não seletivo no controle de agentes invasivos. Ele que age como inibidor competitivo da EPSPS, uma enzima essencial envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos (FIGURA 5) (CUNHA *et al.*, 2005; DEISINGH & BADRIE, 2005; DILL, 2005; VILJOEN, 2005a; POWLES, 2008; VILA-AIUB *et al.*, 2008; BERVALD *et al.*, 2010; GREEN & OWEN, 2011; SHAW *et al.*, 2011).

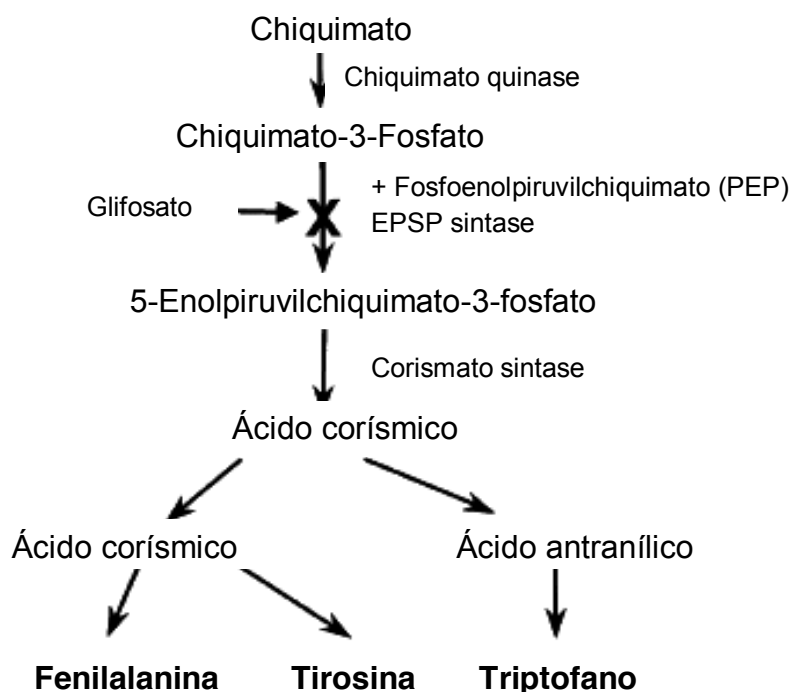


FIGURA 5 - MECANISMO DE AÇÃO DO GLIFOSATO
FONTE: ADAPTADO DE DILL (2005)

A inibição desta enzima provoca atraso no desenvolvimento, desbalanço de aminoácidos e consequente morte da planta (DILL, 2005; DEISINGH & BADRIE, 2005; QUERCY *et al.*, 2006; HEINZ *et al.*, 2011).

A soja transgênica, evento GTS-40-3-2, foi obtida pela introdução no seu genoma, do gene que codifica a enzima EPSPS, isolada da bactéria *Agrobacterium sp.* estirpe CP4 (PADGETTE *et al.*, 1996; CROMWELL *et al.*, 2002; ROTT *et al.*, 2004; DEISINGH & BADRIE, 2005; QUERCY *et al.*, 2006; UJHELYI *et al.*, 2008; DUIJN *et al.*, 2009; GREEN & OWEN, 2011; TIAN *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2012). Para

esta construção foi utilizada a técnica de transformação por aceleração de partículas metálicas recobertas com material genético, denominado biobalística (CUNHA *et al.*, 2005).

Esta enzima é naturalmente menos sensível à inibição pelo glifosato e, plantas que a expressam tornam-se tolerantes ao herbicida *Roundup* (LUTHY, 1999). O inserto para transformação (FIGURA 6) contém, uma região promotora 35S do Vírus do Mosaico da Couve-Flor (CaMV 35S), seguido de peptídeo de trânsito de cloroplasto da EPSPS (CTP EPSPS) de petúnia híbrida, o gene que codifica a proteína EPSPS da *Agrobacterium* sp. cepa CP4 e o terminador de transcrição *nos* da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (PADGETTE *et al.*, 1996; MARCELINO *et al.*, 2003; ROTT *et al.*, 2004; ANDERSEN *et al.*, 2006; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006, DINON *et al.*, 2010).

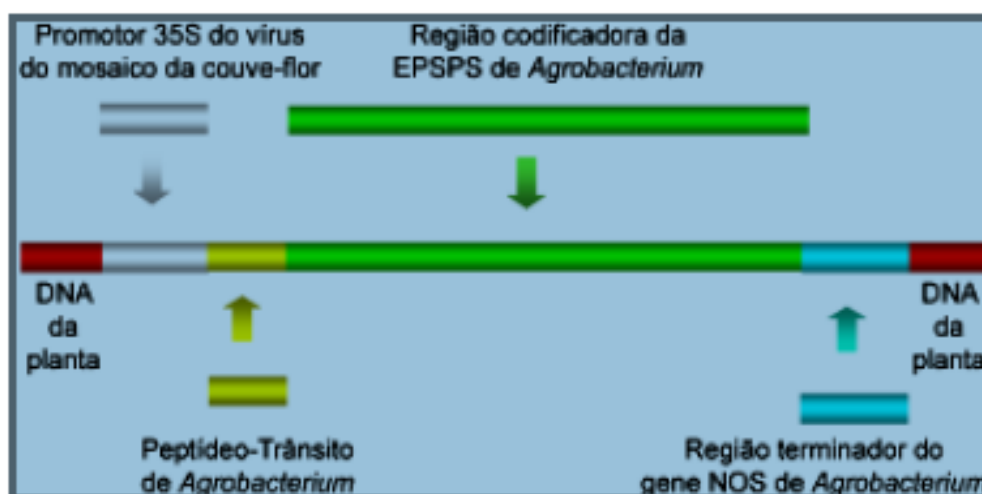


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA CONSTRUÇÃO PRESENTE NA SOJA *ROUNDUP READY*[®]
 FONTE: MARCELINO *et al.*, (2003)

A rápida adoção da soja tolerante ao glifosato no mundo deveu-se, dentre várias vantagens, a benefícios econômicos, flexibilidade e produção eficiente, além da facilidade na conservação das lavouras (DILL, 2005; OWEN & ZELAYA, 2005; SCHUSTER *et al.*, 2007; GREEN & OWEN, 2011).

3.4 EVOLUÇÃO DO CULTIVO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS NO MUNDO

O número de culturas geneticamente modificadas aprovadas, bem como o número de países envolvidos na sua produção, tem aumentado de forma rápida (CARDARELLI *et al.*, 2005; GREINER *et al.*, 2005a; MANO *et al.*, 2009; LI *et al.*; 2011). Segundo relatório do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), em 1996 a área global de culturas geneticamente modificadas era de 1,7 milhões de hectares (ha), em sete países. Esta área aumentou para 40 milhões de hectares em 1999 e em 2007 23 países plantaram culturas GM, tendo a área aumentada para 143,7 milhões de hectares (ADUGNA & MESFIN, 2008; BARROS *et al.*, 2008; JAMES, 2011).

Em 2011, 160 milhões de hectares foram cultivados em 29 países (dos quais 10 industrializados e 19 em desenvolvimento), o que corresponde a um aumento de 8% em relação ao ano de 2010 (FIGURA 7) (JAMES, 2011).

Os 29 países com maior área plantada (em milhões de hectares) com culturas GM, em ordem decrescente são: EUA (69), Brasil (30,3), Argentina (23,7), Índia (10,6), Canadá (10,4), China (3,9), Paraguai (2,8), Paquistão (2,6), África do Sul (2,3), Uruguai (1,3), Bolívia (0,9), Austrália (0,7), Filipinas (0,6), Mianmar (0,3), Burquina Faso (0,3), México (0,2), Espanha (0,1), Colômbia, Chile, Honduras, Portugal, República Checa, Polônia, Egito, Eslováquia, Romênia, Suécia, Costa Rica e Alemanha, sendo que os restantes plantaram menos de 0,1 milhão de ha (JAMES, 2011).

Atualmente, foram aprovadas para comercialização como alimento, rações e para liberação no ambiente, 107 eventos, em 21 culturas geneticamente modificadas (JAMES, 2011), e dessas culturas aprovadas, as principais (GRÁFICO 1) são: soja, ocupando 75,4 milhões de ha (47% da área total ocupada por culturas GM), milho (51 milhões de ha - 32%), algodão (24,7 milhões de ha - 15%) e canola (8,2 milhões de ha - 5%) (ANDERSEN *et al.*, 2006; VILJOEN, 2005a; GREINER & KONIETZNY, 2008b; MARMIROLI *et al.*, 2008; DEMEKE & JENKINS, 2010; JAMES, 2011).

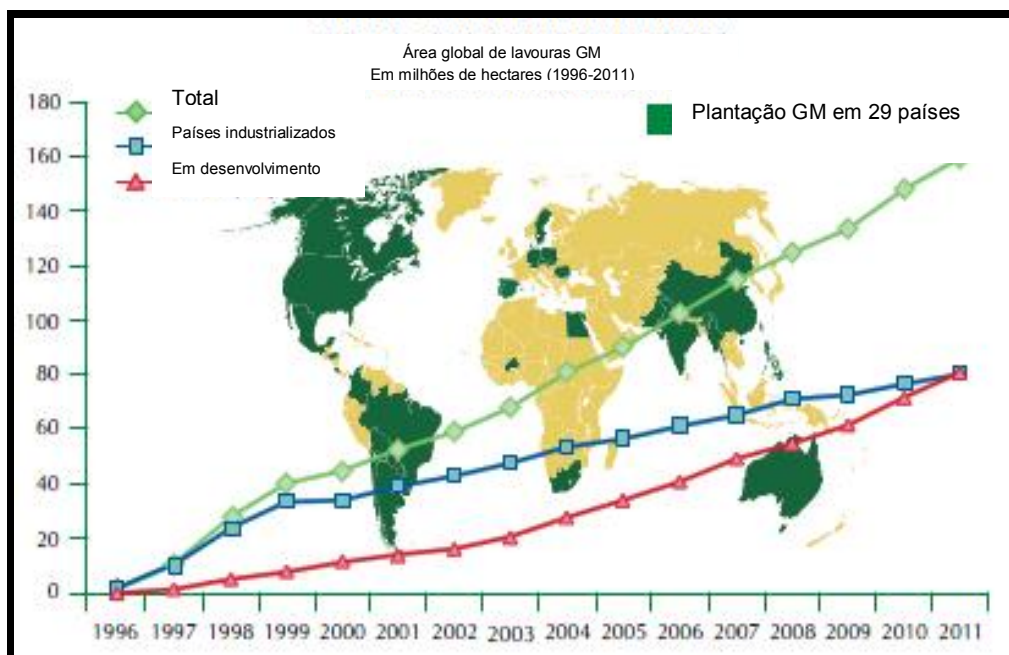


FIGURA 7 - ÁREA GLOBAL DE CULTURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS
FONTE: ADAPTADO DE JAMES (2011)

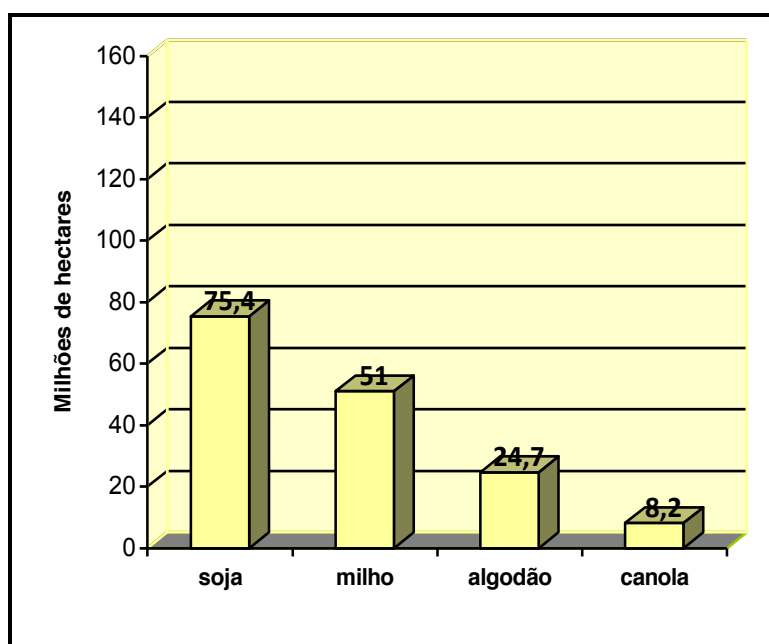


GRÁFICO 1 - ÁREA (MILHÕES DE ha) PLANTADA COM AS PRINCIPAIS CULTURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS NO MUNDO
FONTE: COM BASE EM DADOS DE JAMES (2011)

3.4.1 Cultivo de plantas geneticamente modificadas no Brasil

Em 2010, Brasil plantou 25,4 milhões de ha de culturas geneticamente modificadas (ABRAMILHO, 2012). Em 2011, a área plantada foi de 30,3 milhões de

hectares entre soja, milho e algodão e o país registrou um crescimento de 19,3% liderando pelo terceiro ano consecutivo a expansão do plantio de culturas GM (CIB, 2012).

Dados publicados pela *ISAAA*, em 2011/2012, a área plantada com soja transgênica atingiu 20,6 milhões de ha (representando 82,7% do total da produção nacional da cultura), a de milho 9,1 milhões de ha (64,9%) e a de algodão 0,6 milhões de ha (39,4%) (ABRATES, 2012) e os estados que mais utilizaram a biotecnologia foram, Mato Grosso (com 6,1 milhões de ha), Rio Grande do Sul (5,2 milhões de ha) e o Paraná, com 4,8 milhões de ha (ABRAMILHO, 2012).

Dos 33 eventos transgênicos aprovados, as características predominantes são, resistência a principais espécies de lagarta, tolerância a herbicida a base de glifosato e a combinação das duas características (EMBRAPA, 2012).

Os eventos atualmente aprovados para produção e comercialização no Brasil, encontram-se apresentados no QUADRO 1.

Planta	Evento	Característica inserida
Soja	GTS-40-3-2 BPS-CV127-9 A5547-127 A2704-12 MON87701 X MON89788	Tolerante ao herbicida glifosato Tolerante a herbicidas do grupo das imidazolinonas Tolerante ao herbicida glufosinato de amônio Tolerante ao herbicida glufosinato de amônio Resistente a insetos Lepidópteros e Tolerante ao herbicida glifosato
Milho	T25 MON810 BT11 NK603 GA21 TC1507 BT11 x GA21 MON810 x NK603 MIR162 MON89034 TC1507 x NK603 BT11 x MIR162 x GA21 MON89034 X NK603 MON88017 MON89034 X TC1507 X NK603 MON810 X TC1507 X NK603 TC1507 X MON810 MON89034 X MON88017	Tolerante ao herbicida glufosinato de amônio Resistente a insetos Lepidópteros Resistente a insetos Lepidópteros Tolerante ao herbicida glifosato Tolerante ao herbicida glifosato Resistente a insetos Lepidópteros Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante ao herbicida glifosato Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante ao herbicida glifosato Resistente a insetos Lepidópteros Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante ao herbicida glifosato Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante ao herbicida glifosato Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante ao herbicida glifosato Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante ao herbicida glifosato Resistente a insetos e tolerante a herbicida glifosato e Resistente a insetos Lepidópteros Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante a herbicida glifosato Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante ao herbicida glifosato
Algodão	MON531 LLCotton25 MON1445 281-24-236 x 3006-210-23 MON15985 MON531 x MON1445 GHB614 T304-40 x GHB119 MON88913	Resistente a insetos Lepidópteros Tolerante ao herbicida glufosinato de amônio Tolerante ao herbicida glifosato Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante ao herbicida glufosinato de amônio Resistente a insetos Lepidópteros Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante ao herbicida glifosato Tolerante ao herbicida glifosato Resistente a insetos Lepidópteros e tolerante ao herbicida glufosinato de amônio Tolerante ao herbicida glifosato
Feijão	Embrapa 5.1	Resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro

QUADRO 1 - PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS AUTORIZADAS PARA PRODUÇÃO COMERCIAL NO BRASIL

FONTE: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA (2012)

3.5 LEGISLAÇÃO DE ALIMENTOS CONTENDO ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Os sistemas de segurança alimentar, que incluem instituições, políticas, leis e diretrizes para avaliações, evoluem continuamente ao longo do tempo. Em cada jurisdição, a evolução destes sistemas é afetada tanto pela ciência quanto pela sociedade (COSTA & MARIN, 2011).

A nível científico, os avanços aumentam a compreensão das consequências dos alimentos sobre a saúde, levando a adoção de novas tecnologias de produção de alimentos agrícolas, e, a alteração dos valores sociais pode levar a mudanças na política de defesa dos consumidores e nas regulamentações. Estas, por sua vez, podem afetar tanto a inovação quanto a percepção do risco (COSTA & MARIN, 2011).

Muitos países adotaram políticas que regulamentam alimentos geneticamente modificados (GACHET *et al.*, 1999; CARDARELLI *et al.*, 2005; CANKAR *et al.*, 2006; GREINER & KONIETZNY, 2008b; WANG *et al.*, 2012), porém, as características das regulamentações e seu grau de execução diferem bastante (COSTA & MARIN, 2011).

O Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança (PCB) surgiu para dar cumprimento a Convenção da Diversidade Biológica (MARMIROLI *et al.*, 2008; MANO *et al.*, 2009; AMÂNCIO, 2010). Além de fornecer ferramentas para fazer face ao impacto dos organismos vivos modificados resultantes da biotecnologia moderna, no meio ambiente, o Protocolo visa facilitar a troca de informação científica, técnica e legal, relacionada com OGM, entre países signatários, permitindo aos governos a monitoria e tomada de decisões a níveis nacional, regional e internacional (GRIFFITHS *et al.*, 2000; AHMED, 200; VILJOEN, 2005a; AMÂNCIO, 2010; COSTA & MARIN, 2011).

A regulação dos organismos geneticamente modificados é baseada em dois princípios fundamentais: o Princípio de Equivalência Substancial, adotado pelos EUA, que considera que os OGM são quimicamente equivalentes aos organismos obtidos através de técnicas convencionais de melhoramento genético, não requerendo estudos toxicológicos adicionais; e o Princípio da Precaução, adotado pelos países da UE, que se baseia no gerenciamento do risco e considera que a adoção de uma nova tecnologia ou produto deve ser adiada enquanto não houver evidências suficientes de sua inocuidade (WATANABE & NUTTI, 2002; PELAEZ, 2004; MARMIROLI *et al.*, 2008; DEMEKE & JENKINS, 2010; COSTA & MARIN, 2011).

No Brasil, com base no princípio da precaução para proteção do meio ambiente, foi criada a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). De acordo com a Lei de Biossegurança n° 11.105/2005, a CTNBio é o órgão oficial, responsável por coordenar todas as atividades que envolvam OGMs no país. É de responsabilidade da CTNBio o estabelecimento de 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 o descarte de organismos geneticamente modificados e seus derivados (BRASIL, 2005).

Apesar de todo o processo de segurança relacionado com OGM, a rotulagem de alimentos contendo OGM é exigida em vários países (CARDARELLI *et al.*, 2005; YOSHIMURA *et al.*, 2005; ALEXANDER *et al.*, 2007; DINON *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, a rotulagem é voluntária uma vez que a *Food and Drug Administration* (FDA) considera que, a composição de um alimento que contenha ingredientes derivados de organismos geneticamente modificados não difere significativamente do seu correspondente convencional, não requerendo rotulagem obrigatória (GACHET *et al.*, 1999; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; MARMIROLI *et al.*, 2008; BRANQUINHO *et al.*, 2010; DEMEKE & JENKINS, 2010; COSTA & MARIN, 2011).

Nos países da União Européia, em decorrência da Encefalopatia Espongiforme Bovina e da Influenza aviária, por medida de precaução a rotulagem é obrigatória e o regime de importação de OGM é o mais rigoroso em todo o mundo, uma vez que a legislação exige que produtos alimentares sejam rotulados como contendo OGMs se tiverem conteúdo GM não intencional de 0,9% ou mais (EUROPEAN COMMISSION, 2000; SIERADZKI *et al.*, 2006; STOBIECKA *et al.*, 2007; ADUGNA & MESFIN, 2008; BERDAL *et al.*, 2008; TASKI-AJDUKOVIC *et al.*, 2009; BRANQUINHO *et al.*, 2010; GASPARIC *et al.*, 2010; COSTA & MARIN, 2011).

Os limites tolerados variam de acordo com o país ou bloco de países (TABELA 2) (EUROPEAN COMMISSION, 2000; VILJOEN, 2005a; LEE *et al.*, 2006; BERDAL *et al.*, 2008; TIAN *et al.*, 2011).

TABELA 1 - REGULAMENTO DE ROTULAGEM DE OGM EM ALIMENTOS EM DIFERENTES PAÍSES E OS LIMITES PERMITIDOS

País	Rotulagem	Limite (%)
Austrália e Nova Zelândia	Obrigatória	1
Brasil	Obrigatória	1
Canadá	Voluntária	5
China	Obrigatória	1
União Européia	Obrigatória	0,9
Indonésia	Obrigatória	5
Israel	Obrigatória	0,9
Japão	Obrigatória	5
Filipinas	Voluntária	N/A
Rússia	Obrigatória	0,9
Arábia Saudita	Obrigatória	1
Coreia do Sul	Obrigatória	3
Suíça	Obrigatória	0,9
Taiwan	Obrigatória	5
Tailândia	Obrigatória	5
EUA	Voluntária	N/A

N/A: Não aplicável

FONTE: TIAN *et al.*, (2011)

No Brasil, a Lei de Biossegurança n° 11.105/2005 estabelece que, os alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM ou derivados deverão conter informação nesse sentido em seus rótulos (BRASIL, 2005).

O Decreto n° 4.680/2003, regulamenta ainda o direito a informação quanto a natureza transgênica desses produtos por meio de expressões nos rótulos ou embalagens. Caso a presença de OGM seja acima do limite estabelecido por lei (1%), tanto em produtos embalados quanto os vendidos a granel deve ser informado ao consumidor. Ainda de acordo com o Decreto, alimentos e ingredientes produzidos a partir de animais alimentados com ração contendo ingredientes transgênicos também deverão trazer no painel essa informação (BRASIL, 2003; BROD *et al.*, 2007).

Com a regulação de OGM, que é refletida na legislação de cada país, há necessidade de se estabelecer métodos que permitam distinguir um produto convencional de um geneticamente modificado (EUROPEAN COMMISSION, 2000; VILJOEN, 2005a; BERDAL *et al.*, 2008; TUNG NGUYEN *et al.*, 2008; DINON *et al.*, 2010).

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA

O isolamento e purificação de DNA de qualquer material, é uma etapa crucial para o desenvolvimento de qualquer técnica de análise desta molécula (DEISINGH & BADRIE, 2005; CANKAR *et al.*, 2006; SÁNCHEZ *et al.*, 2006; MARMIROLI *et al.*, 2008).

Diferentes protocolos de extração de DNA são utilizados de acordo com a natureza do material, porém, a maior parte são uma variação de dois protocolos clássicos, o que utiliza o detergente *Cetyl Trimethylammonium Bromide* (CTAB) e o que se baseia na precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos por alta concentração de acetato de potássio na presença de *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) (ARRIEL *et al.*, 2002), sendo o CTAB o mais utilizado em espécies vegetais (GRYSON *et al.*, 2004; ALEXANDER *et al.*, 2007).

O método CTAB, primeiramente descrito por Murray e Thompson em 1980 e posteriormente modificado por Wagner e colaboradores em 1987, é um método de baixo custo, apropriado para a extração e purificação de DNA de plantas e derivados e, em particular, adequado para a eliminação de polissacarídeos e compostos fenólicos que podem afetar a pureza e a qualidade do DNA (LIPP *et al.*, 1999a; LIPP *et al.*, 2001b; BONFINI *et al.*, 2001; ANKLAM *et al.*, 2002; GREINER, 2004; GRYSON *et al.*, 2004; MARMIROLI *et al.*, 2008; DEMEKE & JENKINS, 2010).

Várias modificações e combinações foram desenvolvidas, para adaptá-lo a uma variedade maior de matrizes alimentares (HUPFER *et al.*, 1998; MEYER *et al.*, 1996; POMS *et al.*, 2001; ANKLAM *et al.*, 2002; ARIEL *et al.*, 2002; SÁNCHEZ *et al.*, 2006; ADUGNA & MASFIN, 2008).

Atualmente, existem também métodos de isolamento de DNA genômico de OGMs disponível em formato de *kits* comerciais como, os baseados na ligação do DNA à coluna de sílica ou à esferas magnéticas (BONFINI *et al.*, 2001; TENGEL *et al.*, 2001; ANKLAM *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2005; DEMEKE & JENKINS, 2010), que são também utilizados pela sua conveniência e eficácia no isolamento de DNA de tecidos vegetais (BONFINI *et al.*, 2001).

Além da vantagem acima citada, os *kits* comerciais têm se mostrado eficientes na extração de DNA de algumas matrizes mais complexas, não requerem o uso de solventes como fenol ou clorofórmio durante a extração e envolvem poucas etapas de manipulação das amostras, (BONFINI *et al.*, 2001; ANKLAM *et al.*, 2002; CORBISIER

et al., 2005; DEMEKE & JENKINS, 2010). Os *kits* apresentam a vantagem de serem rápidos comparando com o CTAB. Porém são mais onerosos.

A obtenção de DNA genômico de qualidade e em quantidade, constitui a primeira e a mais crítica etapa para o sucesso de uma análise por PCR e, a qualidade do DNA extraído não somente depende da amostra, como também do método utilizado para o isolamento do mesmo (ANKLAM *et al.*, 2002; MARKOULATOS *et al.*, 2004; TUNG NGUYEN *et al.*, 2009; DEMEKE & JENKINS, 2010; WANG *et al.*, 2012).

3.7 DETECÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

A produção mundial de sementes de espécies GM atingiu proporções significativas, aumentando a preocupação do consumidor com a segurança alimentar e com a qualidades dos alimentos (PESSANHA & WILKINSON, 2003; KAKIHARA *et al.*, 2006).

Os OGM ganharam importância não apenas devido a sua rápida disseminação, mas também, devido a suspeita de que eles não seriam seguros para o consumo (GILBERT, 1999) e também pela constante presença de sementes de plantas GM em lotes de sementes convencionais, tornando-se um problema para o comércio internacional (DE MIRANDA *et al.*, 2005). Estas preocupações motivaram instituições de pesquisa e de inspeção de vários países a desenvolver estratégias e métodos para detecção dos mesmos para monitoramento (PESSANHA & WILKINSON, 2003; CUNHA *et al.*, 2005; GREINER & KONIETZNY, 2008b).

Segundo CRESPO *et al.* (2001); ADUGNA & MASFIN (2008); ASENSIO *et al.*, (2008), a monitoria e detecção de OGM em alimentos, ingredientes e aditivos é necessária por duas razões principais. A primeira porque o consumidor tem o direito de decidir sobre o consumo ou não de alimentos e ingredientes geneticamente modificados, o que levou à adoção de legislação da rotulagem dos alimentos GM. A segunda é porque, se existe legislação, é necessário implementar medidas que garantam que a mesma seja cumprida.

Neste sentido, é imperioso que todos os países e setores envolvidos na produção de alimentos GM estabeleçam, padronizem e validem metodologias adequadas, seguras e econômicas, para uma eficaz detecção, identificação e

quantificação de OGM em alimentos e ingredientes alimentares (BONFINI *et al.*, 2001; DE MIRANDA *et al.*, 2005).

Para compreender o princípio de alguns métodos utilizados para a detecção de um OGM, é importante o conhecimento da estrutura básica do OGM (WURZ *et al.*, 2009; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006) e qualquer estratégia de detecção leva em consideração os elementos do inserto, seja diretamente para o desenho de iniciadores usados na detecção do DNA recombinante ou indiretamente para a detecção de proteínas ou produtos derivados dos OGM (UJHELYI *et al.*, 2008).

Os principais métodos analíticos de detecção de espécies GM podem ser divididos em dois: com base na presença de proteínas que são os produtos finais ou com base na sequência de DNA inserida (QUADRO 2). Os métodos que avaliam proteínas geralmente são os imunoenzimático como *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), *western blot* ou imunocromatográfico como tiras de fluxo lateral (TFL) e os que avaliam DNA são, a reação de polimerase em cadeia (PCR) e suas variantes como a PCR qualitativa, a PCR qualitativa competitiva (PCR-QC) e a PCR em tempo real (PCR-TR) (GACHET *et al.*, 1999; BONFINI *et al.*, 2001, AHMED, 2002; MARKOULATOS *et al.*, 2004; DEISINGH & BADRIE, 2005; DE MIRANDA *et al.*, 2005; SÁNCHEZ *et al.*, 2006; ADUGNA & MESFIN, 2008; ASENSIO *et al.*, 2008; GREINER & KONIETZNY, 2008b; NIKOLIC *et al.*, 2009; BRANQUINHO *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2011).

Parâmetros	Pesquisa de proteína			Pesquisa de DNA		
	Western blot	ELISA	TFL	PCR qualitativa	PCR-QC	PCR-TR
Facilidade de uso	Difícil	Moderado	Simples	Difícil	Difícil	Difícil
Equipamentos especiais	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Sensibilidade	Alta	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta
Duração	2 dias	8h	10min	1dias	2dias	1dias
Custo/amostra (dólares)	150	20	10	250	400	450
Resultados quantitativos	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Praticidade para teste em campo	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
Empregado	Academia	Laboratório	Campo	Laboratório	Laboratório	Laboratório

QUADRO 2 - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DOS PRINCIPAIS MÉTODOS USADOS NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OGMs EM ALIMENTOS

FONTE: ADAPTADO DE ANKLAM, (2002)

3.7.1 Detecção de OGM com base na presença de proteínas

3.7.1.1 Imunoensaio

Os imunoensaios, são sistemas de medição analíticos que utilizam anticorpos com alta especificidade e afinidade pela molécula alvo, como reagentes de teste (BONFINI *et al.*, 2001; QUERCY *et al.*, 2006). São utilizados para detecção e quantificação de “novas” proteínas, introduzidas na planta através da manipulação genética (ANKLAM *et al.*, 2002; MARKOULATOS *et al.*, 2004; ALEXANDER *et al.*, 2007).

Estes métodos nem sempre possibilitam a detecção de OGM, como em casos de alimentos processados, uma vez que a natureza química da proteína pode ser removida ou desnaturada com o processamento, promovendo a alteração da sua conformação e impedindo o seu reconhecimento pelo anticorpo específico (BONFINI *et al.*, 2001; AHMED, 2002; ANKLAM *et al.*, 2002; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2012).

Várias outras situações são apontadas como desfavoráveis a utilização destes métodos, como: quando o nível de expressão da proteína transgênica é muito baixo, nas partes da planta que são utilizadas na produção de alimentos (BONFINI *et al.*, 2001; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; ALEXANDER *et al.*, 2007); quando algumas sequências de DNA introduzidas não são expressas como proteínas, como no caso do tomate *Flavr Savr*, onde apenas RNA é produzido (LUTHY, 1999; MARKOULATOS *et al.*, 2004) e quando as variedades GM apresentam diferentes eventos e expressam a mesma proteína transgênica (ANKLAM *et al.*, 2002; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; ALEXANDER *et al.*, 2007). Os tipos de imunoensaios mais comuns são descritos a seguir.

3.7.1.1.1 *Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*

O princípio do ELISA fundamenta-se no ensaio de duplo anticorpo ou *sandwich*, que utiliza dois anticorpos (mono ou policlonais) específicos para o antígeno (proteína transgênica) (AHMED, 2002; ADUGNA & MESFIN, 2008;

ASENSIO *et al.*, 2008). Um dos anticorpos (Acs) é utilizado na sensibilização da microplaca, visando a captura do antígeno (Ag) presente na amostra do alimento, e o outro geralmente está conjugado a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que revela a reação (reação colorimétrica) (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; ASENSIO *et al.*, 2008).

Uma outra variação do ELISA, que também é utilizada na detecção e quantificação de OGMs, é o ensaio competitivo, onde o Ag presente na amostra e um padrão (Ag conjugado com uma enzima) competem pela ligação do anticorpo de captura. Neste ensaio, a concentração de Ag é inversamente proporcional à intensidade colorimétrica produzida (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006). O ensaio de duplo anticorpo é mais recomendado que o competitivo, tendo em vista a sua maior sensibilidade (AHMED, 2002).

A utilização de anticorpos monoclonais, tanto para a captura quanto para a detecção (conjugado) aumenta a especificidade do teste ELISA (AHMED, 2002). Por outro lado, anticorpos policlonais aumentam a sensibilidade, visto que podem reconhecer diferentes epitopos da proteína (PAN, 2002).

De acordo com QUERCY *et al* (2006), pesquisas para detecção específica da proteína CP4-EPSPS na soja *Roundup Ready*[®], indicaram que o método é capaz de detectar a presença de OGMs em material cru, numa concentração entre 0,3% e 5%.

O ELISA é um método sensível, específico, seguro, robusto, rápido e que geralmente não requer muito treinamento. Além disso, é ideal para a análise quantitativa simultânea de um número grande de amostras (AHMED, 2002; PAN, 2002; ASENSIO *et al.*, 2008; ALEXANDER *et al.*, 2007).

3.7.1.1.2 *Western blot*

O *Western blot*, é um método semi-quantitativo, altamente específico e indicado para análise de proteínas insolúveis (AHMED, 2002). Consiste em solubilizar as proteínas extraídas da amostra com detergentes e agentes redutores, separá-las em campo elétrico por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferí-las para uma membrana de nitrocelulose, que é imersa em uma solução contendo anticorpos que reconhecem a proteína alvo, que são coradas posteriormente (AHMED, 2002; PAN, 2002).

Alguns problemas de solubilização, agregação e co-precipitação da proteína alvo com as outras proteínas presentes na amostra, causados pela separação eletroforética das proteínas, são eliminados (AHMED, 2002).

Este método apresenta um limite de detecção que varia entre 0,25% para sementes e 1% para alimentos processados (AHMED, 2002; PAN, 2002; ADUGNA & MESFIN, 2008). Por ser um método mais laborioso, é indicado para aplicação em pesquisas e pouco aplicado na análise de rotina de OGM (PAN, 2002).

Segundo CONCEIÇÃO *et al* (2006), a elevada especificidade do *Western blot* faz com que este seja geralmente utilizado para confirmar amostras que apresentaram resultado positivo nos testes ELISA ou TFL.

3.7.1.2. Imunocromatográfico

3.7.1.2.1 Tira de fluxo lateral (TFL)

A tira de fluxo lateral é considerada uma variante do teste ELISA (AHMED, 2002; PAN, 2002; ADUGNA & MESFIN, 2008). Nesta técnica, os anticorpos específicos à proteína são acoplados a um reagente colorido e incorporados em uma tira de nitrocelulose. Ao introduzir a tira em uma fração de extrato que contenha a proteína alvo (transgênica), forma-se um co-anticorpo que incorporado ao reagente colorido, flui na tira através de uma membrana porosa (AHMED, 2002; PAN, 2002).

A tira contém duas zonas de captura, uma específica para a proteína transgênica e a outra para os anticorpos que não reagirão (AHMED, 2002; PAN, 2002; ALEXANDER *et al.*, 2007). A presença de uma única linha na membrana, indica a negatividade da amostra e duas linhas a positividade da mesma (AHMED, 2002; PAN, 2002; CUNHA *et al.*, 2005).

É uma técnica econômica e bastante apropriada como método inicial no rastreamento de OGM na cadeia alimentar. Encontra-se disponível na forma comercial (*kits*) para aplicação no campo, e o seu baixo poder de detecção é afetado principalmente pelo grau de degradação da proteína, não sendo viável para aplicação em produtos que tenham sofrido algum tipo de processamento. O método fornece somente resultado qualitativo (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; ALEXANDER *et al.*, 2007).

3.7.2 Detecção de OGM com base na presença de DNA

Apesar da existência de outras metodologias para análise de produtos geneticamente modificados (biológica, imunológica), as técnicas de detecção de ácidos nucleicos são actualmente as mais utilizadas para avaliação de presença de OGMs em grãos crus ou alimentos processados (WANG *et al.*, 2012). Como todo organismo que tenha sofrido alteração do seu genoma, a prova irrefutável da modificação consiste na identificação da principal molécula alterada, ou seja, o DNA.

Na maior parte dos países produtores e consumidores, a PCR é considerada a técnica de referência nas transações comerciais e rotulagem de alimentos, por esta ser sensível e necessitar de pequenas quantidades de amostra, simplificando sua adoção na rotina de detecção (ANKLAM *et al.*, 2002; JACCAUD *et al.*, 2003; MEYER, 1999; YAMAGUCHI *et al.*, 2003).

De acordo com AHMED (2002), CONCEIÇÃO *et al.* (2006), ADUGNA & MESFIN (2008), TASKI-AJDUKOVIC *et al.*, (2009), para análise de produtos altamente processados, alimentos ou ingredientes, é recomendada a aplicação de métodos baseados no DNA, que é uma molécula mais estável em relação às proteínas.

3.7.2.1 *Polymerase chain reaction* (PCR)

A PCR é a principal técnica utilizada para detecção, identificação e quantificação de OGM em produtos alimentares (TENDEL *et al.*, 2001; PETIT *et al.*, 2003; CARDARELLI *et al.*, 2005; TANI *et al.*, 2005; ABDULLAH *et al.*, 2006; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; KAKIHARA *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006; GREINER & KONIETZNY, 2008b; TUNG NGUYEN *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009; DEMEKE & JENKINS, 2010; TIAN *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012). Consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA, utilizando um par de oligonucleotídeos (*primers*) que flanqueiam a região a ser amplificada (GACHET *et al.*, 1999; MESQUITA *et al.*, 2001; ANKLAM *et al.*, 2002).

A PCR foi concebida por Kary Mullis em 1983, e rapidamente tornou-se uma técnica amplamente utilizada em biologia molecular, por ser um meio rápido de produzir um número maior de cópias de moléculas de DNA a partir de pequenas

quantidades do mesmo ácido nucléico, mesmo quando a fonte é relativamente de baixa qualidade (MULLIS & FALOONA, 1987; GIBBS, 1990; MESQUITA *et al.*, 2001).

Um ciclo da PCR consiste em três etapas, sendo a primeira etapa a desnaturação, onde a cadeia dupla da molécula de DNA é separada em duas cadeias simples, por aquecimento a temperatura elevada (94-96°C). Segue-se a segunda etapa, o anelamento ou hibridização, em que a temperatura é reduzida (50-55°C) permitindo que os *primers* se liguem especificamente aos fragmentos complementares de DNA de fita simples. Por fim a extensão (72°C), onde através da atividade da enzima DNA polimerase, são sintetizadas novas fitas de DNA por incorporação de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), fitas estas que servirão de molde no ciclo seguinte (FIGURA 8) (GACHET *et al.*, 1999; KUBISTA *et al.*, 2006; SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

Normalmente são realizados de 30 a 40 ciclos para cada reação, e porque ambas cadeias são copiadas durante a PCR, o aumento do número de cópias da sequência de DNA alvo é exponencial, gerando bilhões de cópias (ANKLAM *et al.*, 2002).

Além de ser uma técnica que permite rápida amplificação *in vitro* de pequenas quantidades de DNA, a PCR também é capaz de detectar uma série de eventos e de distinguir as variedades GM que apresentam diferentes construções gênicas, porém expressam a mesma proteína (YAMAGUCHI *et al.*, 2003; TUNG NGUYEN *et al.*, 2008).

Vários estudos para detecção de OGMs (como por exemplo a soja *RR*[®]) foram realizados utilizando a PCR (STUDER *et al.*, 1998; VAN HOEF *et al.*, 1998; HUBNER *et al.*, 1999; HURST *et al.*, 1999; MATSUOKA *et al.*, 1999; VOLLENHOFER *et al.*, 1999; WANG & FANG, 2005; TUNG NGUYEN *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2011).

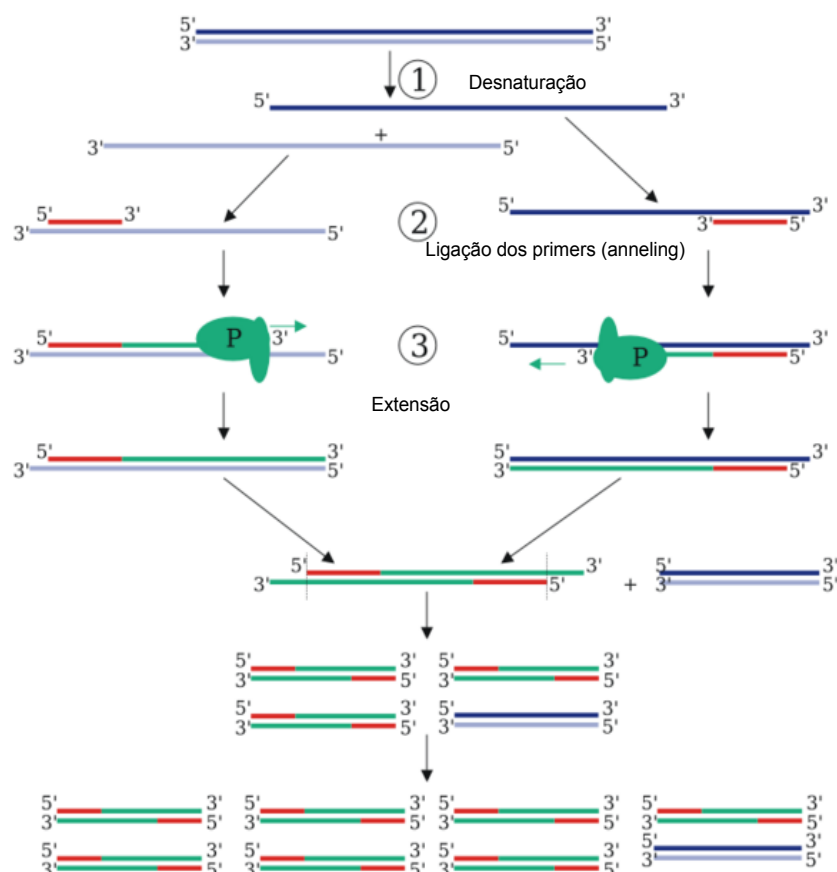


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DA PCR
 FONTE: GEORGE (2012)

Apesar de ser uma técnica altamente sensível e específica (TENDEL *et al.*, 2001; AHMED *et al.*, 2002; ANKLAM *et al.*, 2002; HOLST-JENSEN *et al.*, 2003; PETIT *et al.*, 2003; GREINER *et al.*, 2005a; TANI *et al.*, 2005; KAKIHARA *et al.*, 2006), a PCR apresenta algumas limitações como, a ocorrência frequente de falsos positivos, uma vez que a técnica não discrimina a amplificação de genes oriundos de OGMs daqueles existentes na natureza e utilizados nas construções, como o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor ou o terminador NOS da *Agrobacterium tumefaciens*; o elevado custo, a necessidade de material de referência certificado (MARKOULATOS *et al.*, 2004; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006) e a falta de informação quantitativa (BONFINI *et al.*, 2001; ANKLAM *et al.*, 2002).

Dentre os fatores determinantes para o sucesso da reação destacam-se, a amostragem, o tamanho de partículas das amostras, o método de extração utilizado, matrizes contendo interferentes para extração e amplificação (agentes quelantes, polissacarídeos, ácidos, detergentes, sais e compostos fenólicos) bem como o grau

de processamento dos materiais (GACHET *et al.*, 1999; AHMED, 2002; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006).

Para fazer face às limitações que esta técnica apresenta, novos métodos estão sendo desenvolvidos como biosensores, cromatografia e espectrometria de massa, microarranjos e fluorescência baseada no raio-x (DEISINGH & BADRIE, 2005; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; MARMIROLI *et al.*, 2008; BRANQUINHO *et al.*, 2010; GERDES *et al.*, 2012).

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Na análise de OGMs em alimentos, uma das etapas mais importantes é a quantificação, uma vez que determina a percentagem (%) e/ou quantidade total de um tipo específico de OGM ou grupos de OGMs (AHMED, 2002; GREINER *et al.*, 2005a; UJHELYI *et al.*, 2008) e auxilia no controle de limites máximos de rotulagem impostos (AHMED, 2002; MARKOULATOS *et al.*, 2004; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006).

Segundo HOLST-JENSEN *et al.*, (2003), esta quantificação deve ser relativa a algo. Na legislação europeia, a quantificação é relativa ao ingrediente (por exemplo, farinha de milho) usualmente interpretada com base no peso do produto. Mas também poderia ser relativa a uma quantidade específica (volume ou peso) de uma matriz (por exemplo, cerveja ou pão), ou número de unidades (partículas, DNA ou moléculas de proteína). Porém, não existe uma relação exata entre o peso ou número de grãos e moléculas de DNA. No entanto, as melhores estimativas podem ser obtidas com métodos analíticos, supondo que o número de moléculas de DNA obtidas a partir de uma unidade de peso ou de grão é o mesmo, independentemente da origem GM ou não-GM.

3.8.1 PCR quantitativa competitiva

A PCR quantitativa competitiva (PCR-QC) é uma técnica que disponibiliza meios para determinação de quantidades relativas de DNA (HUBNER *et al.*, 1999). É baseada na comparação da quantidade final de DNA amplificado de dois alvos: a sequência de interesse a ser quantificada e o competidor, que é o DNA artificial

adicionado em quantidade conhecida antes da amplificação e que é co-amplificado no mesmo tubo de reação (HEID *et al.*, 1996; BONFINI *et al.*, 2001; ANKLAM *et al.*, 2002; VILJOEN, 2005a; QUERCI *et al.*, 2006; SHIMIZU *et al.*, 2008; UJHELYI *et al.*, 2008).

A quantificação é feita no ponto em que a amplificação do alvo produz sinal de intensidade equivalente a uma das concentrações do competidor, quando visualizado em gel de agarose (SHIMIZU *et al.*, 2008). Cada amostra é amplificada com quantidades crescentes do competidor, enquanto o volume/concentração da amostra é mantido constante (BONFINI *et al.*, 2001; ANKLAM *et al.*, 2002).

A PCR-QC tem como vantagem o fato de qualquer variação na eficiência da amplificação dos dois alvos ou a presença de substâncias inibidoras afetar a amplificação dos dois alvos de igual forma. Porém, tem como desvantagens, o fato de necessitar de desenvolvimento de competidores apropriados para cada OGM e há risco de contaminação cruzada devido a excessiva manipulação (ANKLAM *et al.*, 2002; HOLST-JENSEN *et al.*, 2003; MARKOULATOS *et al.*, 2004; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006; ADUGNA & MASFIN, 2008).

3.8.2 PCR em tempo real

A PCR em tempo real (PCR-TR), uma variante da PCR convencional, compreende a amplificação da sequência de DNA alvo e o seu monitoramento em tempo real (HEID *et al.*, 1996; BONFINI *et al.*, 2001; MARKOULATOS *et al.*, 2004; ANDERSEN *et al.*, 2006; SÁNCHEZ *et al.*, 2006; LA PAZ *et al.*, 2007; UJHELYI *et al.*, 2008).

Inicialmente foi desenvolvida por Higuchi e colaboradores em 1992 (BONFINI *et al.*, 2001). Atualmente é a ferramenta quantitativa mais confiável para a quantificação de OGMs em alimentos (DEISINGH & BADRIE, 2005; CANKAR *et al.*, 2006; SÁNCHEZ *et al.*, 2006; LA PAZ *et al.*, 2007; MARMIROLI *et al.*, 2008; SHIMIZU *et al.*, 2008; DEMEKE & JENKINS, 2010).

A quantidade de moléculas amplificadas na reação é medida pela detecção de sinais fluorescentes. Estes são gerados por corantes intercalantes ou por sondas de hibridização (moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico) (MARKOULATOS *et al.*, 2004; NOVAIS & ALVES, 2004; VILJOEN, 2005a;

ANDERSEN *et al.*, 2006; KUBISTA *et al.*, 2006). Estes sinais aumentam de forma proporcional com a quantidade de produto de PCR produzido em cada ciclo de reação (PAN, 2002; MOCELLIN *et al.*, 2003; ANDERSEN *et al.*, 2006). O primeiro aumento significativo da fluorescência corresponde à quantidade inicial de cópias de DNA alvo (HEID *et al.*, 1996, AHMED, 2002).

Segundo NOVAIS & ALVES, (2006), a curva obtida na PCR-TR divide-se em três fases distintas. A fase linear, no qual a fluorescência emitida está abaixo do limiar de detecção (*threshold line*). Segue-se a fase exponencial, quando a emissão de sinal fluorescente supera o limiar de detecção, ficando estabelecido o ciclo de detecção (*threshold cycle-Ct*), que é o ponto no qual a curva de amplificação cruza o limiar de detecção. Esta fase é também caracterizada pelo aumento exponencial no sinal fluorescente emitido (ΔR_n). Por fim a fase estacionária (também denominada *platô*), em que o sinal torna-se constante, correspondendo ao final da análise devido a exaustão dos componentes da reação (FIGURA 9).

A curva de amplificação é desenhada a partir do número de ciclos da reação (eixo x) e a quantidade de fluorescência (ΔR_n) (eixo y), que é calculada pela seguinte equação:

$$\Delta R_n = (R_{n+}) - (R_{n-}) \quad (\text{Equação 1})$$

R_{n+} é a intensidade da emissão do fluoróforo dividido pela intensidade da emissão do supressor durante o ciclo de amplificação,

R_{n-} é a intensidade da emissão do fluoróforo dividido pela intensidade da emissão do supressor previamente à amplificação.

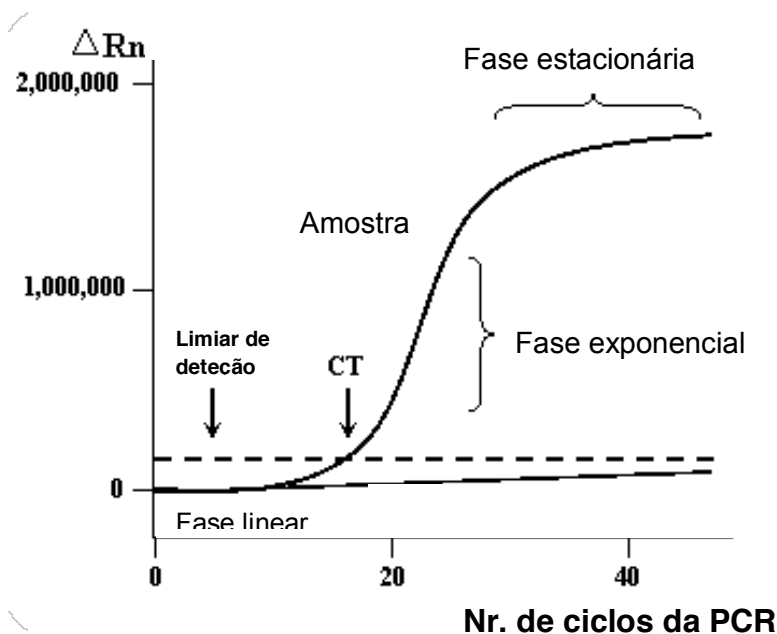


FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FASES DA PCR EM TEMPO REAL
 FONTE: ADAPTADO DE NCBI (2012)

No início da amplificação, o sinal fluorescente emitido é usualmente muito fraco e não pode ser distinguido do ruído. Durante a amplificação exponencial, a emissão de fluorescência duplica a cada ciclo, e é nesse ponto que se observa a melhor correlação entre quantidade inicial de cópias de DNA presentes em uma amostra e a quantidade de produto formado (HEID *et al.*, 1996, AHMED, 2002; KUBISTA *et al.*, 2006).

Para a quantificação, é usado o número de ciclos da PCR necessários para gerar fluorescência, estatisticamente e significativamente acima da linha de base ou ruído, o Ct, e este valor é inversamente proporcional a quantidade inicial de DNA alvo. Isto é, quanto maior o número de cópias de DNA alvo no início da reação, menor o número de ciclos necessários para se atingir o ponto onde o sinal de fluorescência é detectado acima do ruído (BONFINI *et al.*, 2001; MOCELLIN *et al.*, 2003; SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

Para proceder a análise quantitativa do teor de OGM numa determinada amostra, podem ser usados dois sistemas: através da quantificação do número de cópias dos genes amplificados (endógeno e transgênico) separadamente, comparando as curvas-padrão ou através do método ΔCt , calculado pela diferença entre os Cts dos dois alvos (HOLST-JENSEN *et al.*, 2003; MARMIROLI *et al.*, 2008).

Na quantificação do número de cópias são geradas duas curvas-padrão que permitem a determinação da razão inicial dos moldes na reação (MARKOULATOS *et al.*, 2004). As quantidades do gene endógeno e do gene GM são determinadas por interpolação com as respectivas curvas-padrão. O cálculo do teor de material GM é feito pela razão entre o número de cópias do DNA alvo (transgênico) e o número de cópias do gene característico da espécie (gene endógeno), multiplicada por 100% (ANKLAM *et al.*, 2002; YOSHIMURA *et al.*, 2005; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; ALEXANDER *et al.*, 2007).

No método ΔCt , compara-se a quantidade relativa das duas sequências alvo, onde $\Delta Ct = Ct \text{ gene geneticamente modificado} - Ct \text{ gene endógeno}$. O conteúdo do OGM na amostra é determinado por interpolação do valor do ΔCt com as diversas concentrações do material de referência (HOLST-JENSEN *et al.*, 2003; ALEXANDER *et al.*, 2007).

Além de detectar a presença de DNA introduzido em alimentos, a PCR-TR também permite a quantificação dos mesmos (MARKOULATOS *et al.*, 2004; CORBISIER *et al.*, 2005; CANKAR *et al.*, 2006; UJHELYI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2012) e apresenta vantagens como, níveis mais altos de sensibilidade e especificidade, rapidez e risco reduzido de contaminação devido ao desenvolvimento de moléculas fluorogênicas que eliminaram a necessidade de uma etapa de pós-PCR (ANKLAM *et al.*, 2002; HOLST-JENSEN *et al.*, 2003; MOCELLIN *et al.*, 2003; TANI *et al.*, 2005; CANKAR *et al.*, 2006; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; LA PAZ *et al.*, 2007; SHIMIZU *et al.*, 2008; WAIBLINGER *et al.*, 2010), economizando tempo (HEID *et al.*, 1996).

A especificidade da técnica não só depende do instrumento utilizado para monitorar o sinal, como também, dos sistemas químicos que são usados para permitir o monitoramento da reação de amplificação (ANKLAM *et al.*, 2002; MARMIROLI *et al.*, 2008; GASPARIC *et al.*, 2010) e os mais utilizados para PCR quantitativa, são descritos a seguir.

3.8.2.1 SYBR Green

O *SYBR green* é o marcador químico não baseado em sonda mais comumente utilizado na PCR-TR (LA PAZ *et al.*, 2007; MARMIROLI *et al.*, 2008). O

sistema envolve a incorporação do corante intercalante SYBR Green, que se liga de maneira inespecífica à fita dupla de DNA (VILJOEN, 2005a; GASPARIC *et al.*, 2010). Como consequência dessa ligação, é emitida uma fluorescência que aumenta significativamente à medida que a reação ocorre (FIGURA 10) (MARMIROLI *et al.*, 2008).

No início da reação, a mistura contém o DNA, os iniciadores, o fluoróforo, e a fluorescência é reduzida, uma vez que o fluoróforo não está ligado a dupla fita de DNA, conseqüentemente este sinal é subtraído durante a análise pelo *software* (NOVAIS & ALVES, 2004). Durante a extensão dos iniciadores pela polimerase, as moléculas de fluoróforo ligam-se ao DNA que está sendo sintetizado. No fim da fase de extensão de cada ciclo, a fluorescência é mensurada (MARKOULATOS *et al.*, 2004).

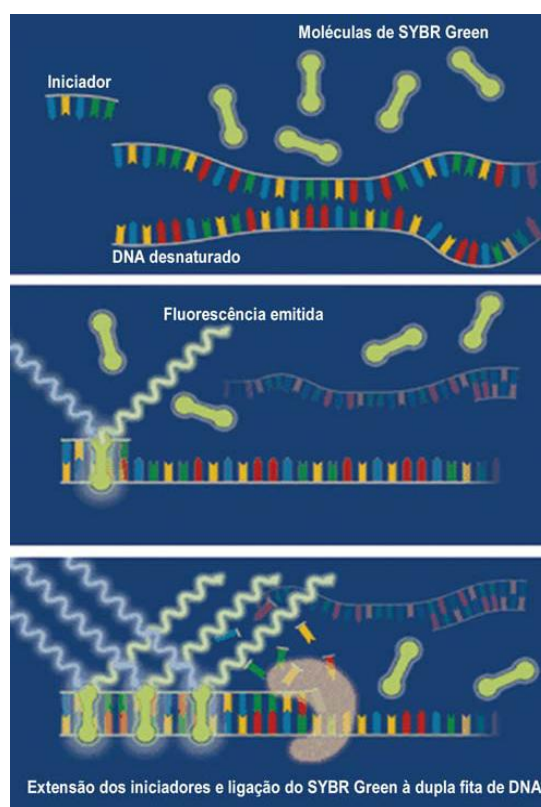


FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DA REAÇÃO DO CORANTE INTERCALANTE *SYBR GREEN*
 FONTE: BIOSEARCH TECHNOLOGIES (2012)

O sistema de quantificação utilizando o *SYBR green* tem a vantagem de ser sensível, ter custo reduzido e facilidade de manuseio (NOVAIS & ALVES, 2004; KUBISTA *et al.*, 2006). Porém, a maior limitação do mesmo é a inespecificidade, uma

vez que toda fita dupla de DNA formada, incluindo produtos inespecíficos como dímeros de *primers* são quantificados (BONFINI *et al.*, 2001; QUERCI *et al.*, 2006; GASPARIC *et al.*, 2010).

Assim, para superar estas limitações, testes de confirmação/validação como a análise da curva de dissociação tornam-se necessários, para confirmar se o sinal monitorado provém da sequência alvo (BONFINI *et al.*, 2001; ANKLAM *et al.*, 2002; LA PAZ *et al.*, 2007).

3.8.2.2 Sondas *TaqMan*

TaqMan é um dos sistemas mais utilizados na PCR-TR. Caracteriza-se como uma sonda fluorogênica que utiliza a atividade exonucleásica 5`-3` da *Taq* polimerase para produzir um sinal fluorescente, como resultado da hidrólise do oligonucleotídeo (MARKOULATOS *et al.*, 2004).

A sonda consiste em um oligonucleotídeo que contém um fluoróforo que emite fluorescência quando excitado (o *reporter*, que geralmente é a 6-carboxifluoresceína-FAM) e um supressor (*quencher*, geralmente a 6-carboxitetrametil-rodamina-TAMRA) que suprime esta emissão quando este estiver próximo ao fluoróforo (FIGURA 11) (BONFINI *et al.*, 2001; NOVAIS & ALVES, 2004; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006).

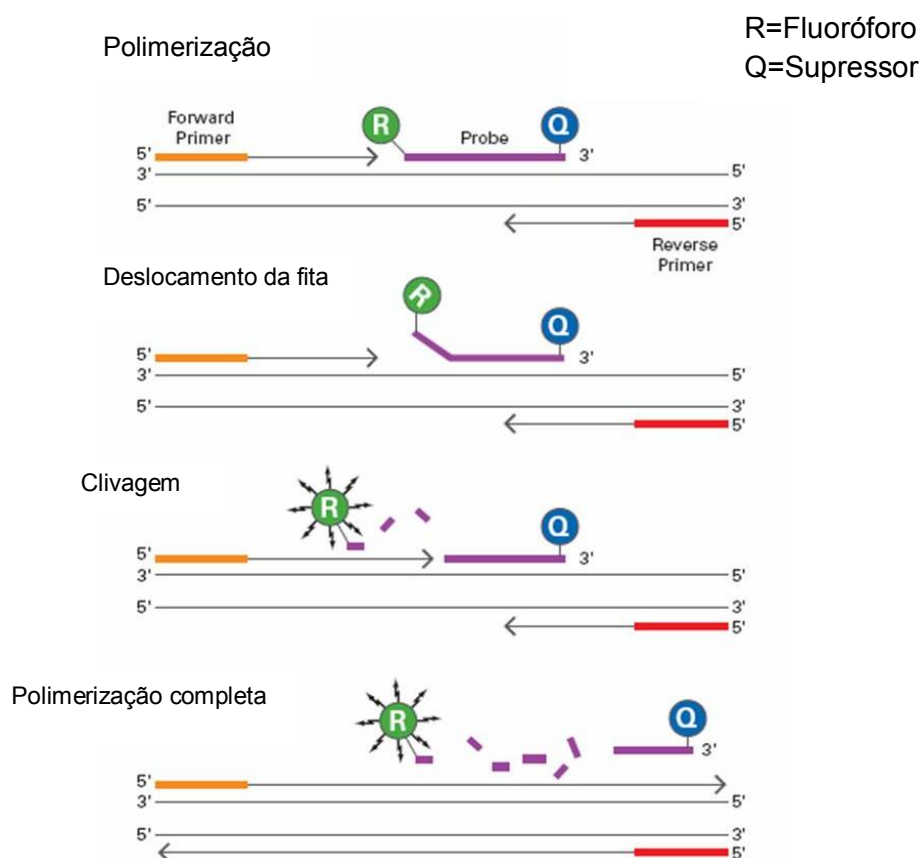


FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DA SONDA *TaqMan*
 FONTE: ADAPTADO DE ASURAGEN (2012)

Quando a hibridização ocorre, a atividade exonucleásica 5'–3' da *Taq* polimerase cliva a sonda interna durante a etapa de extensão, ocorrendo liberação do corante fluoróforo. Consequente há emissão do sinal fluorescente e, quando a sonda está intacta, a fluorescência emitida pelo fluoróforo é suprida pela proximidade do corante supressor (BONFINI *et al.*, 2001; NOVAIS & ALVES, 2004; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006). A terminação 3' da sonda é fosforilada para evitar a extensão da mesma.

A disponibilidade de múltiplos fluoróforos para sondas *TaqMan* torna possível a detecção da amplificação de mais de uma sequência alvo em um tubo de reação (KUBISTA *et al.*, 2006). Um fluoróforo é distinguível de outro (por exemplo, FAM e um controle interno) porque eles emitem fluorescência em comprimentos de onda distintos (BONFINI *et al.*, 2001).

Devido a sua especificidade, a sonda *TaqMan* liga-se especificamente ao produto amplificado (DNA alvo) e dímeros de iniciadores não são detectados por esta, o que constitui uma vantagem adicional para sua utilização (MARKOULATOS *et al.*, 2004; MANO *et al.*, 2009).

3.8.2.3 Sondas *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET)

As sondas FRET correspondem a um par de oligonucleotídeos que estão marcados com um composto fluorescente. O mecanismo é baseado na transferência de energia, em que uma molécula doadora transfere energia para uma molécula receptora, ocorrendo a emissão de fluorescência (FIGURA 12) (QUERCI *et al.*, 2006).

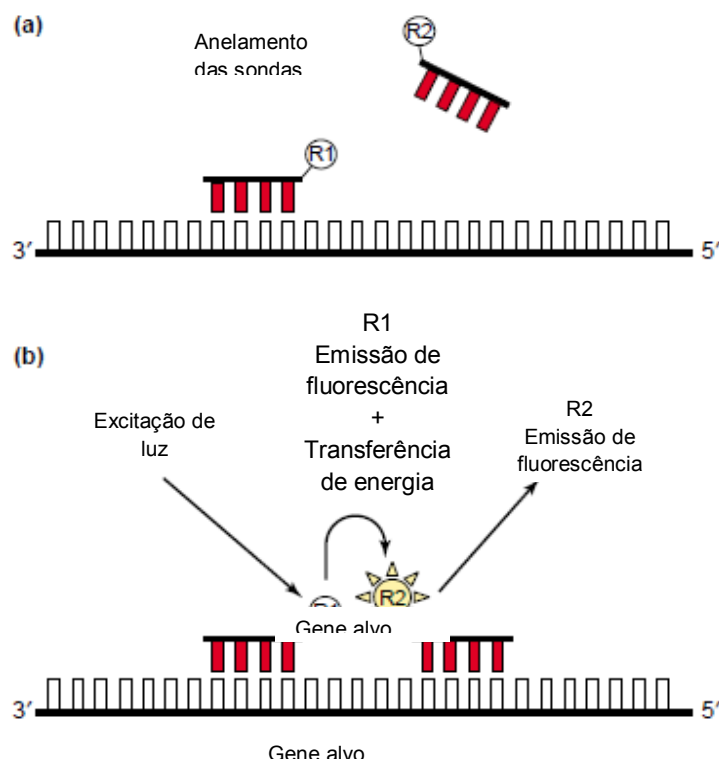


FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DA SONDA *FRET*
 FONTE: ADAPTADO DE MOCELLIN *et al.*, (2003)

Estas sondas de hibridização são desenhadas como um par em que uma sonda é marcada com um fluoróforo na extremidade 3', e a outra sonda é marcada com outro fluoróforo na extremidade 5'. Quando os dois fluoróforos encontram-se próximos um do outro na cadeia de DNA, ocorre a excitação do dador resultando na transferência de energia para o receptor (QUERCI *et al.*, 2006).

As sondas FRET fornecem um nível alto de especificidade devido ao uso de duas sondas de hibridização adjacentes. Se estas sondas não forem clivadas durante a reação de PCR, podem ser aplicadas as curvas de *melting* como teste de confirmação para PCR. Tem a vantagem de quantificar várias moléculas alvo numa única reação (BONFINI *et al.*, 2001).

3.8.2.4 Sondas *Scorpions*

A sonda *Scorpion* consiste de uma sonda com sequência específica. Possuem uma estrutura em forma de pinça, contendo na haste uma sequência complementar ao DNA alvo em que na extremidade 5' situa-se o fluoróforo e na extremidade 3' o supressor que por sua vez está ligado à extremidade 5' do *primer* (FIGURA 13). Durante a amplificação, a sequência específica da sonda liga-se à sua sequência complementar de DNA. Esta hibridização faz com que ocorra o distanciamento entre os fluoróforos e o sinal fluorescente é observado e mensurado (QUERCI *et al.*, 2006).

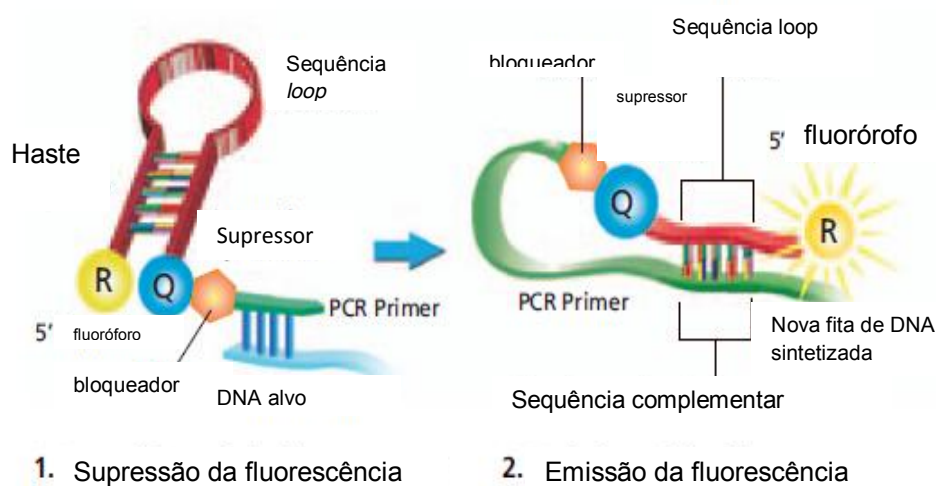


FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DA Sonda *SCORPION*
 FONTE: ADAPTADO DE SIGMA-ALDRICH (2012)

Os *primers* *Scorpion* não necessitam de extensão da cadeia complementar, bloqueando a sua extensão para assegurar que a estrutura em haste da sonda seja quebrada apenas durante a hibridização específica. Diferentemente das outras sondas, a sonda *Scorpions* não requer a separação com os *primers* (QUERCI *et al.*, 2006).

3.8.2.5 Sondas *Molecular beacons*

Molecular beacons são oligonucleotídeos usados como sondas de fita simples, que formam uma estrutura secundária (haste-e-loop) entre as extremidades

5` e 3`. A sequência *loop* é complementar à sequência alvo específica e a haste é formada pelo anelamento das sequências complementares que estão localizadas nas extremidades. Um fluoróforo é covalentemente ligado no final de uma das extremidades e um supressor na extremidade oposta (FIGURA 14) (NOVAIS & ALVES, 2004; QUERCI *et al.*, 2006).

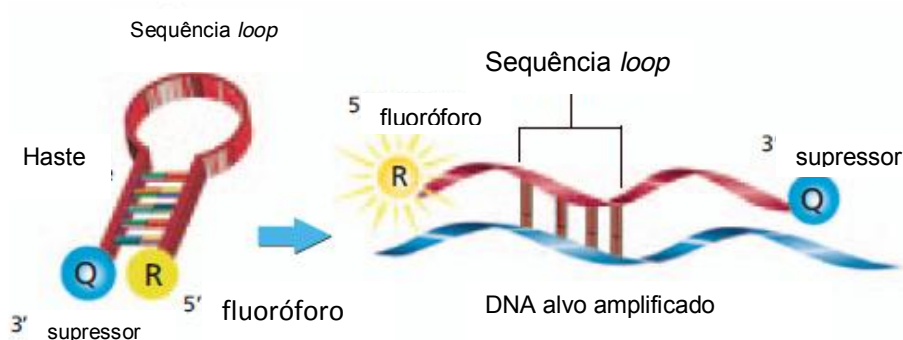


FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DA SONDA *MOLECULAR BEACONS*

FONTE: ADAPTADO DE SIGMA-ALDRICH (2012)

Quando hibridizam com a fita de DNA contendo a sequência alvo, as sondas assumem uma mudança conformacional tornando-as capazes de emitir fluorescência. Na ausência de alvos, elas não emitem fluorescência, pois o supressor está próximo do fluoróforo captando energia (NOVAIS & ALVES, 2004; QUERCI *et al.*, 2006).

As sondas *molecular beacons* tem sido usadas com sucesso na PCR-TR. Apesar de serem menos populares para aplicação na PCR-TR, elas são amplamente utilizadas para discriminar diferenças em pares de base simples. Elas podem ser adaptadas para a detecção e quantificação de novas plantas GM que apresentam modificações genéticas em um único nucleotídeo (BONFINI *et al.*, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Um total de 16 amostras foram analisadas, sendo oito compostas de sementes puras (certificadas) de soja e oito de grãos de soja (amostras de campo). As sementes puras de soja convencional e geneticamente modificada evento *Roundup Ready*[®] (RR), foram fornecidas pela Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB) e os grãos de soja convencional e *Roundup Ready*[®], foram adquiridos das cooperativas locais produtoras de soja.

Sementes certificadas de soja GM adquiridas da empresa Pioneer Hi-Bred International, Inc. (EUA), foram utilizadas como controle positivo de transgenia (com designação SST) e como controle negativo, foram utilizadas amostras certificadas por uma empresa local produtora de soja (com designação SSØ e Ø). Como controles de extração de DNA e de PCR foi usado água ultra pura.

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

A amostragem das sementes foi realizada no laboratório da Empresa Paranaense de Classificação de Produtos (CLASPAR) e de acordo com as normas estabelecidas pela *International Seed Testing Association* (ISTA). Estas amostras seguiram um protocolo de contaminação intencional (PINTO *et al.*, 2011). Na sequência foram trituradas até a obtenção de farelo de soja.

O preparo das amostras de sementes de soja contaminadas foi elaborado de acordo com o QUADRO 4, onde a cada porção de 500 g de soja não-GM retiradas de diferentes pontos de um *container*, foram-lhes substituídas de 2 a 20 sementes de soja não-GM pelo mesmo número de sementes de soja *Roundup Ready*[®].

Amostras (sementes de soja não-GM)	Quantidade (g)	N. de sementes de soja RR Adicionadas
SS2	500	2
SS3		3
SS5		5
SS6		6
SS9		9
SS10		10
SS15		15
SS20		20

QUADRO 3 – CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DAS SEMENTES DE SOJA
 FONTE: ADAPTADO DE PINTO *et al.*, (2011)

O mesmo procedimento foi aplicado para os grãos de soja provenientes de campo, porém, foram utilizadas porções de 100 g de soja não-GM em que de 1 a 14 grãos de soja não-GM foram substituídos pelo mesmo número de sementes de soja *Roundup Ready*[®] (QUADRO 4).

Amostra (grãos de soja não-GM)	Quantidade (g)	N. de sementes de soja RR adicionadas
Cc 1	100	1
Cc 2		2
Cc 3		3
Cc 5		5
Cc 10		10
Cc 11		11
Cc 13		13
Cc 14		14

QUADRO 4 – CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DOS GRÃOS DE SOJA
 FONTE: ADAPTADO DE PINTO *et al.*, (2011)

Para cada amostra, este processo de contaminação intencional foi realizado em triplicata.

Antes e entre o preparo de uma amostra e outra, foi feita a devida limpeza da superfície de trabalho e dos equipamentos com solução de hipoclorito de sódio concentrado, água destilada e álcool (70%), para prevenir a contaminação entre as amostras.

Após obtenção de uma mistura homogênea de farelo de soja, as amostras foram embaladas em sacos plásticos, empacotadas, identificadas e conservadas a 4°C até serem submetidas à extração de DNA.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração de DNA genômico das amostras, foi utilizado o método CTAB (*Cetyl Trimethylammonium Bromide*) e todas as amostras foram extraídas em triplicata.

4.3.1 *Cetyl trimethylammonium bromide* (CTAB)

O DNA de farelo de soja foi isolado usando o método CTAB, de acordo com o protocolo descrito por GREINER & KONIETZNY (2008), com algumas modificações (PINTO *et al.*, 2011).

Foram pesados 2 g de cada amostra de farelo de soja, num tubo de 50 mL e adicionados 10 mL de tampão de extração (10 mM Tris, 20 mM Na₂-EDTA, 1,4 NaCl, 20 g/L CTAB, pH 8,0). Homogeneizou-se o material e incubou-se em banho-maria a 60°C por 1 hora, homogeneizando-se por inversão a cada 5 minutos. Após incubação, o material foi resfriado até atingir a temperatura ambiente e centrifugado por 10 minutos a 1.000 x g.

Em seguida, 1 mL de cada amostra foi transferido para novos tubos de 2 mL, aos quais foram adicionados 5 µL de proteinase k a 20 mg/mL e incubados a 55°C por 30 minutos. Após incubação, adicionaram-se aos tubos, 5 µL de RNase a 10 mg/mL e incubaram-se novamente a 37°C por 30 minutos.

Obtendo-se o sobrenadante por centrifugação, 500 µL deste foram transferidos para novos tubos de 2 mL e adicionou-se 200 µL de clorofórmio puro, misturou-se cuidadosamente por inversão durante 30 segundos e centrifugou-se por 10 minutos a 10.000 x g. Após centrifugação, a fase superior foi transferida para novos tubos aos quais foram adicionados 2 volumes de solução de precipitação CTAB (40 mM NaCl, 5 g/L CTAB, pH 8.0), misturados e incubados a 25°C por 60 minutos.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi descartado (tendo o cuidado para não descartar o *pellet*) e o precipitado dissolvido em 350 µL de cloreto de sódio a 1,2 M. Adicionou-se 350 µL de clorofórmio, homogeneizou-se cuidadosamente por inversão por 30 segundos e

centrifugou-se por 10 minutos a 10.000 x g. A fase superior de cada amostra foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL onde foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol, homogeneizados por inversão e centrifugados por 10 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi removido completamente e, aos tubos contendo *pellet*, foram adicionados 500 µL de etanol a 70%, homogeneizados e centrifugados por 10 minutos a 10.000 x g. Removeu-se o sobrenadante completamente, o DNA foi seco em estufa a 37°C por 10 minutos até a completa evaporação do etanol.

O DNA foi dissolvido em 100 µL de água ultra pura e os tubos foram posteriormente incubados em banho-maria a 50°C por 15 minutos. Por fim, as amostras de DNA extraído foram conservadas a -20°C para garantir a sua integridade no decorrer das análises.

4.4 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DO DNA

Após a extração do DNA, as amostras foram diluídas na proporção de 1:50 e quantificadas em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000 UV), com leitura de absorbância a 260nm. A pureza do material extraído foi analisada a partir da razão entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm. Uma vez obtidos os valores das absorbâncias a 260nm, determinou-se a concentração do DNA presente nas amostras.

Paralelamente, realizou-se a electroforese do DNA genômico em gel de agarose a 0,8%, com a finalidade de verificar a presença de DNA, proteínas e de arrastão nas amostras.

4.5 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR CONVENCIONAL

As amostras de DNA extraído, foram primeiramente submetidas a reação de amplificação utilizando *primers* específicos para o gene de referência endógena (lecitina da soja), para confirmação de presença de resíduos de soja na amostra e verificação da qualidade do DNA e, para identificação da soja RR[®], foram utilizados *primers* específicos que paream na sequência que codifica a região EPSPS. Os

primers, suas sequências e tamanho esperado dos fragmentos amplificados apresentam-se no QUADRO 5.

<i>Primer</i>	Sequência (5´-3´)	Alvo	Tamanho do Fragmento Amplificado (pb)
GMO3	GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C	Gene da Lecitina da soja	118
GMO4	GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG		
p35S-f2	TGA TGT GAT ATC TCC ACT GAC G	Gene codificador da EPSPS	172
petu-r1	TGT ATC CCT TGA GCC ATG TTG		

QUADRO 5 – SEQUÊNCIA DE *PRIMERS* UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR QUALITATIVO
 FONTE: GREINER & KONIETZY (2008)

As reações de amplificação ocorreram em tubos de 0,2 mL num volume final de 10 µL contendo tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, cada *primer* (0,5 µM para o gene da lecitina da soja e 0,8 µM para o gene da soja RR), *Taq* DNA polimerase (1,5 U para o gene da lecitina da soja e 1 U para o gene da soja RR) e 3 µL de DNA molde puro.

As condições de amplificação para o gene da lecitina da soja foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento a 60°C por 30 segundos; extensão a 72°C por 1 minuto, e uma etapa de extensão final a 72°C por 3 minutos.

Para o gene da soja transgênica, foi utilizado o seguinte protocolo de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento a 61°C por 30 segundos; extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 3 minutos. As reações foram conduzidas em um termociclador (*Veriti, Applied Biosystems*). Os produtos das amplificações foram conservados a 4°C, até sua análise eletroforética.

4.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Obtidos os produtos da amplificação do gene da lecitina, estes foram aplicados em gel de agarose (INVITROGEN) a 1,5% e submetidos a corrida eletroforética em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 1X, por aproximadamente 1 hora, a 80 Volts (V). Após separação eletroforética, o gel foi corado com solução de Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) por 15 minutos e descorado em água destilada por 8 minutos.

Os fragmentos separados eletroforéticamente foram visualizados sob luz Ultra violeta (UV) e fotodocumentados no transiluminador (Loccus biotecnologia L.Pix).

As amostras que apresentaram resultado positivo (banda esperada) para a amplificação do gene lecitina, foram submetidas a amplificação para o gene *Roundup Ready*[®] e posteriormente submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

4.7 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

Após PCR convencional, todas as amostras de sementes e grãos de soja foram submetidas a amplificação por PCR em tempo real, para amplificação do gene de referência endógena (lecitina da soja) e do gene que codifica a região EPSPS da soja RR, usando dois *kits* diferentes e seguindo as recomendações dos fabricantes.

No primeiro ensaio, as reações de amplificação em tempo real foram conduzidas em microplacas de 96 poços, num volume final de 10 µL contendo: 5,2 µL de Reconstituted mericon Assay (GMO ou Reference System-Quiagen) (que inclui PCR Assay GMO, PCR Assay Reference System, Multiplex PCR Master Mix, tampão de diluição, água livre de RNase, corante ROX), e 4,8 µL de controle positivo/ controle negativo/ padrões/ amostras. A sonda para o alvo RRS é marcada com o corante fluorescente *reporter* FAM (6-carboxifluoresceína) e a sonda para o alvo endógeno é marcada com o corante fluorescente *reporter* VIC (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxifluoresceína).

Os extratos de DNA usados na reação de PCR das diferentes amostras e diferentes concentrações foram: puro e diluído 1:4 segundo recomendações do fabricante.

As reações foram conduzidas no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos de desnaturação, 60°C por 30 segundos de anelamento e 72°C por 10 segundos de extensão.

No segundo ensaio, as reações de amplificação em tempo real foram conduzidas em microplacas de 96 poços, num volume final de 25 µL contendo: Maxima SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) (incluindo Maxima[®] hot start *Taq* DNA Polimerase, dNTPs, marcador SYBR[®] Green, MgCl₂, tampão de

PCR, corante de referência passiva ROX), 0,3 μ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*), os mesmos utilizados na PCR convencional (QUADRO 3), água ultra pura e 10 μ L de DNA molde.

A concentração de DNA foi padronizada para 20 ng/ μ L seguindo recomendações do fabricante e, uma vez que a análise espectrofotométrica os valores das concentrações de DNA das amostras foram variáveis, estas foram diluídas afim de se obter a concentração desejada. As reações foram conduzidas no mesmo equipamento utilizado no primeiro ensaio, com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos de desnaturação e 60°C por 60 segundos de anelamento/extensão.

Os resultados das curvas de amplificação e dos valores de *threshold cycle* (Ct), que representa o ciclo da PCR no qual o *software* detecta o primeiro aumento significativo de fluorescência acima do sinal de base para determinada amostra, foram analisados através do 7500 *Software Version 2.05* (*Applied Biosystems*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Na maior parte das triplicatas das amostras, o DNA extraído apresentou boa qualidade e em quantidade apropriada (FIGURA 15). A eficiência do método de extração, tanto das sementes com contaminação experimental quanto dos grãos de soja provenientes de campo, foi determinada pela quantidade e qualidade do DNA genômico, através da determinação espectrofotométrica da absorbância e por espectrofotometria.

A quantificação por espectrofotometria fornece informação sobre a concentração de ácidos nucleicos, porém, não é essencial ter-se só DNA com concentração aceitável, mas também DNA puro, isto é, livre de contaminantes como por exemplo proteínas e resíduo de fenol.

A pureza foi determinada pela razão entre a absorbância da amostra em 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}). Uma vez que a extração de DNA de cada amostra dos dois grupos foi realizada em triplicata, para continuidade do trabalho foram selecionadas as amostras que apresentaram melhores valores, tanto de concentração quanto de pureza de DNA. Os dados brutos obtidos da leitura das absorbâncias encontram-se nos QUADROS 6 e 7.

A concentração de DNA variou de 60 a 245 ng/ μ L nas sementes contaminadas intencionalmente com 10 e 6 grãos de soja RR, respectivamente, e de 22,5 a 190 ng/ μ L nos grãos de soja contaminados com uma e 11 sementes de soja RR, respectivamente. Com relação à pureza, nas sementes e grãos a variação foi de 1,45 a 2,4 e de 0,78 a 2,5 respectivamente. Os rendimentos obtidos no presente trabalho foram compatíveis com estudo realizado por ZHOU *et al.*, (2007), em que a pureza de DNA extraído de sementes de soja foi em torno de 1,8. Da mesma forma estudos realizados por TUNG NGUYEN *et al.*, (2009); TIAN *et al.*, (2011) onde foram utilizados grãos de soja e alimentos contendo soja, a pureza obtida variou entre 1,7 a 1,9 no DNA extraído.

Nr.	Amostras certificadas (Sementes puras de Soja)	Absorbância (nm)		Razão	[DNA]
		260	280	A260/A280	(ng/μl)
1	SS2a	0.020	0.015	1.33	50.0
2	SS2b	0.032	0.016	2.0	80.0
3	SS2e	0.009	0.007	1.28	22.5
4	SS3d	0.033	0.008	4.12	82.5
5	SS3b	0.053	0.043	1.23	132.5
6	SS3c	0.094	0.061	1.54	235.0
7	SS5d	0.022	0.020	1.1	55.0
8	SS5e	0.038	0.030	1.26	95.0
9	SS5c	0.064	0.044	1.45	160.0
10	SS6a	0.011	0.014	0.78	27.5
11	SS6b	0.061	0.048	1.27	152.5
12	SS6c	0.098	0.062	1.58	245.0
13	SS9a	0.062	0.040	1.55	155.0
14	SS9b	0.018	0.004	4.5	45.0
15	SS9d	0.029	0.012	2.4	72.5
16	SS10a	0.016	0.005	3.2	40.0
17	SS10b	0.024	0.004	6.0	60.0
18	SS10c	0.021	0.014	1.5	52.5
19	SS15a	0.058	0.031	1.87	145.0
20	SS15b	0.072	0.040	1.8	180.0
21	SS15c	0.046	0.018	2.5	115.0
22	SS20a	0.007	0.001	7.0	17.5
23	SS20b	0.027	0.018	1.5	67.5
24	SS20c	0.021	0.007	1.16	52.5
25	SSTa	0.042	0.036	1.16	105.0
26	SSTb	0.067	0.039	1.71	167.5
27	SSTc	0.046	0.032	1.43	115.0
28	SSØa	0.076	0.049	1.55	190.0
29	SSØb	0.091	0.050	1.82	227.5
30	SSØc	0.047	0.030	1.56	117.5
31	Øa	0.032	0.027	1.18	80.0
32	Ød	0.021	0.008	2.62	52.5
33	Øe	0.023	0.007	3.28	57.5

QUADRO 6 – DADOS DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO DO DNA DAS SEMENTES DE SOJA
AS LETRAS DE a-c REPRESENTAM A TRIPLICATA PARA CADA AMOSTRA
FONTE: O AUTOR (2012)

Nr.	Amostras de campo (Grãos de Soja)	Absorbância (nm)		Razão	[DNA]
		260	280	A260/A280	(ng/ μ l)
1	Cc 1a	0.002	0.000	—	5.0
2	Cc 1b	0.007	0.006	1.16	17.5
3	Cc 1c	0.009	0.005	1.8	22.5
4	Cc 2a	0.002	0.006	0.33	5.0
5	Cc 2b	0.010	0.004	2.5	25.0
6	Cc 2c	0.005	0.007	0.71	12.5
7	Cc 3a	0.014	0.004	3.5	35.0
8	Cc 3b	0.011	0.005	2.2	27.5
9	Cc 3c	0.018	0.006	3.0	45.0
10	Cc 5a	0.013	0.018	0.72	32.5
11	Cc 5b	0.018	0.022	0.81	45.0
12	Cc 5c	0.012	0.013	0.92	30.0
13	Cc 10a	0.045	0.026	1.73	112.5
14	Cc 10b	0.054	0.059	0.91	135.0
15	Cc 10c	0.000	0.005	0.0	0.0
16	Cc 11a	0.059	0.046	1.28	147.5
17	Cc 11b	0.073	0.045	1.62	182.5
18	Cc 11c	0.076	0.044	1.72	190.0
19	Cc 13a	0.015	0.019	0.78	37.5
20	Cc 13b	0.011	0.015	0.73	27.5
21	Cc 13c	0.015	0.019	0.78	37.5
22	Cc 14a	0.005	0.016	0.31	12.5
23	Cc 14b	0.004	0.006	0.66	10.0
24	Cc 14c	0.012	0.005	2.4	30.0

QUADRO 7 – DADOS DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO DO DNA DOS GRÃOS DE SOJA
AS LETRAS DE a-c REPRESENTAM A TRIPPLICATA PARA CADA AMOSTRA
FONTE: O AUTOR (2012)

Estes valores indicam que as sementes de soja apresentaram melhor concentração e melhor qualidade de DNA, comparando com os grãos de soja, apesar de algumas amostras de sementes terem apresentado valores de grau de pureza inferiores a 1,8.

O fato de os melhores valores de pureza ter sido apresentado pelas sementes de soja e não pelos grãos, deve-se a diferença sutil, porém fundamental, existente entre os dois grupos de amostras. O grão é o que se colhe e semente, para além de ser o que se planta, é o resultado de muitos anos de pesquisa e desenvolvimento. Da semente é possível ter-se garantia de pureza, qualidade, origem, entre outras características, o que não acontece com os grãos (CORBISIER *et al.*, 2005).

Para a confirmação dos resultados acima obtidos, a análise eletroforética a 0,8% em gel de agarose foi feita e, a partir desta, foi possível observar bandas, mostrando que o método CTAB foi eficiente para a extração de DNA dos dois grupos de amostras (FIGURA 15) e o DNA extraído foi suficiente para ser usado na amplificação do gene de interesse por PCR.

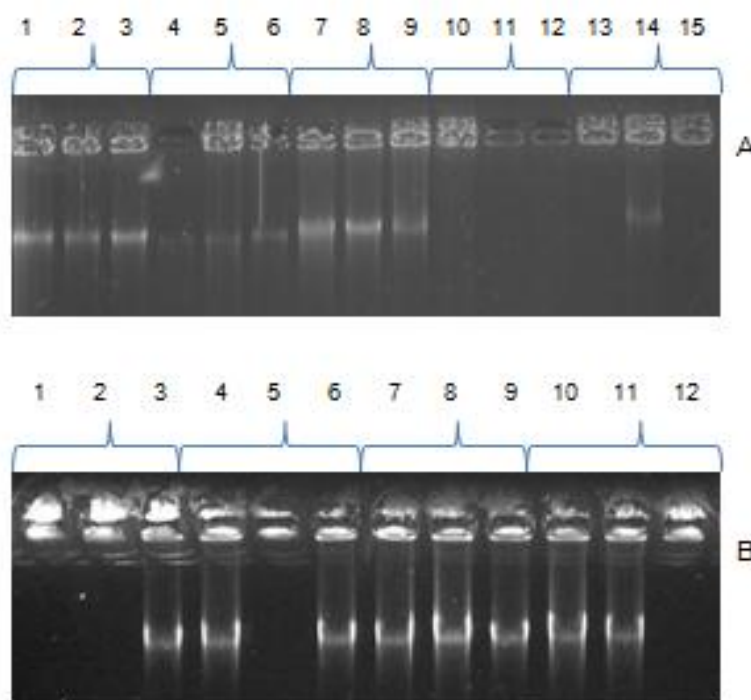


FIGURA 15 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (0,8%) DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DA SOJA EM TRIPLICATA, PELO MÉTODO CTAB

A - Colunas 1-15: sementes de soja

B - Colunas 1-12: grãos de soja

FONTE: O AUTOR (2012)

Casos de insucesso na espectrofotometria, as amostras devem ser submetidas à reação de amplificação por PCR, que pode apresentar resultado positivo, indicando a baixa sensibilidade do método de quantificação espectrofotométrica ou erros significativos que o método pode sofrer devido a interferência pelas impurezas do DNA ou por degradação parcial do DNA (EUROFINS, 2007).

A extração de DNA genômico é um pré-requisito fundamental para o emprego de métodos de detecção e quantificação de OGM em alimentos por PCR (DEISINGH, *et al.*, 2005). No entanto, o preparo das amostras é um dos fatores que influencia na eficiência desta extração (MARCELINO *et al.*, 2007). Os vários métodos de extração

existentes não são abrangentes a todas as amostras, diferem significativamente no que concerne a concentração e pureza do produto final extraído, podendo influenciar na qualidade dos resultados qualitativo e quantitativo (FERREIRA *et al.*, 2009).

Dos vários procedimentos de extração de DNA descritos na literatura, observa-se que protocolos padrão são utilizados com algumas modificações, visando adequar o método às necessidades específicas da espécie em estudo (ARRIEL *et al.*, 2002; ROTT *et al.*, 2004; SOLLÉRO *et al.*, 2004; CORBISIER *et al.*, 2007).

De acordo com GREINER *et al.*, (2005); TUNG NGUYEN *et al.*, (2008); NIKOLIC *et al.*, (2009) o método CTAB tem sido amplamente utilizado para extração de DNA a partir de folhas, sementes/grãos de milho e soja assim como em ração animal. Envolve basicamente a extração e precipitação do DNA e posterior purificação da molécula.

Trabalhos realizados comprovam a eficiência deste método não só em matéria prima como também em produtos alimentares com alto nível de processamento (CARDARELLI *et al.*, 2005; GREINER *et al.*, 2005; KAKIHARA *et al.*, 2006; VILJOEN *et al.*, 2006b; MARCELINO *et al.*, 2007; TUNG NGUYEN *et al.*, 2008; DINON *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2011). Outros estudos ainda enfatizam a utilização do método CTAB na extração de DNA de peixes (SOLLÉRO *et al.*, 2004).

Segundo TENDEL *et al.*, (2001); GREINER *et al.*, (2005), o sistema clássico de extração baseado no método CTAB resulta num DNA com integridade suficiente para análise por PCR, porém, a pureza do mesmo é baixa e o processo de extração consome mais tempo, havendo necessidade de uso de *kits* comerciais que garantam a purificação da amostra, como *Dneasy Plant Mini Kit* (Quiagen) e *Wizard* (Promega).

Ainda que o método de extração tenha efeitos significativos na qualidade e quantidade de DNA extraído, estudos realizados demonstram que estes parâmetros são afetados significativamente pela condição da amostra antes da extração como, a mostragem, o tamanho da amostra, o tipo de matriz, a presença de substâncias inibidoras na matriz do alimento, o grau de degradação do DNA, e pelos parâmetros físicos e químicos dos métodos de extração utilizados (SOLLÉRO *et al.*, 2004; CORBISIER *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2009).

De acordo com ARRIEL *et al.*, (2002), usando o método CTAB, é possível se obter concentrações de 10 a 200 ng/ μ L a partir de 50 a 200 mg de amostra. No presente trabalho o valor mínimo de concentração obtido foi de 30 ng/ μ L, partindo-se de 2000 mg. O fato de se ter obtido uma concentração pequena de DNA tendo-se

partido de uma quantidade grande de amostra, pode ter sido devido ao processo físico ao qual as amostras foram submetidas, o que pode ter levado a degradação do DNA.

Este resultado é suportado por estudo realizado por VIJAYAKUMARA *et al.*, (2009), em que foi necessário aumentar a concentração de 200 mg para 500 mg de farinha de soja autoclavada para que a amostra fosse quantificável, tendo obtido após o aumento da quantidade de amostra, um rendimento de 30 ng/mg, reforçando a hipótese de que a quantidade de DNA extraído de uma amostra pode ser afetada por processos físicos, que neste caso particular foi pelo tratamento da mesma com calor e que varia com a severidade do método de processamento utilizado.

Uma amostra de DNA é considerada pura quando a razão A260/A280 é de 1,8 a 2,0. Porém, nem todos os valores da razão obtidos no presente estudo encontram-se dentro desta faixa, assim, valores inferiores a 1,8 indicam que pode haver traços de proteínas e/ou outras substâncias em demasia na amostra. Enquanto que valores acima de 2,0 indicam que as amostras podem estar contaminadas com substâncias inibidoras como polissacarídeos, sais, lípidos e compostos fenólicos que interferem na reação de PCR (ARRIEL *et al.*, 2002; KAKIHARA *et al.*, 2006; TUNG NGUYEN *et al.*, 2008; UJHELYI *et al.*, 2008). Nestes casos deve-se repetir a etapa de precipitação do DNA (CORBISIER *et al.*, 2007).

É importante salientar que a maneira como a amostra é conservada também é importante em qualquer procedimento de extração de DNA (SOLLÉRO *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2009), fato que foi observado e seguido no presente trabalho.

Segundo MELO *et al.*, (2010), após o isolamento do DNA das amostras, recomenda-se que seja armazenado abaixo de 0°C, para minimizar a atividade de degradação das DNAses, em tubo de plástico, hidrofóbico e com tampa de vedação eficaz para prevenir a evaporação. O DNA purificado pode ser armazenado em tampão tris-EDTA (TE), pH 7,2, por 26 semanas à temperatura ambiente, por um ano a 2-8°C (na ausência de DNAses), por até sete anos em *freezer* a -20°C e por mais do que isso a -70°C. O *freezer* usado não deve ser do tipo *frost-free*, visto que esse mecanismo faz com que a temperatura oscile, causando deterioração por cisalhamento dos ácidos nucleicos.

5.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR

5.2.1 Amplificação do gene específico da soja (lecitina)

A análise qualitativa dos extratos de DNA das amostras obtidas pelo método CTAB foi realizada pela submissão das mesmas à reação de amplificação por PCR. Na reação, foi usada uma sequência alvo, o gene de referência endógena da soja (lecitina da soja) que sempre está presente na soja ou em produtos contendo na sua composição ingredientes derivados da soja. Todas as amostras (8 compostas de sementes de soja e 8 de grãos de soja), incluindo as que não apresentaram resultado satisfatório na eletroforese em gel de agarose de DNA genômico, foram amplificadas usando um par de *primers* específico, denominado GMO3/GMO4 (MEYER *et al.*, 1996; GREINER & KONIETZY, 2008).

Na eletroforese em gel de agarose a 1,5%, as amostras e os controles (positivo e negativo) produziram o fragmento esperado de 118 pb (FIGURAS 16 e 17), o que demonstra que a região específica do gene da lecitina da soja foi amplificada. Foram também analisados os controles de extração de DNA e de PCR, com o objetivo de comprovar se não teria ocorrido contaminação durante os processos. No gel de agarose não foram visualizadas bandas, demonstrando que não houve contaminação tanto na fase de extração quanto na PCR.

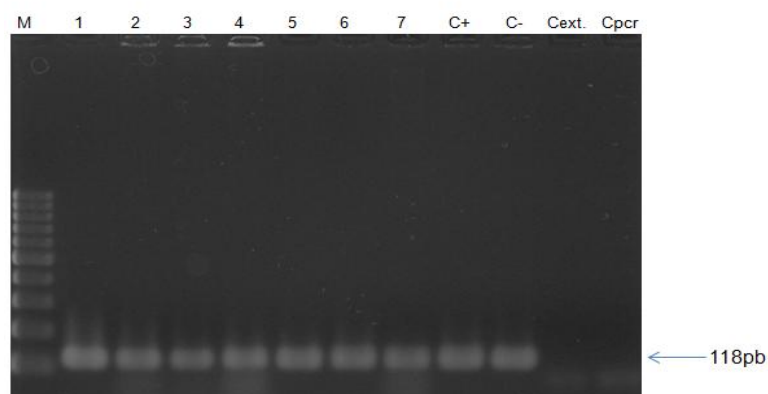


FIGURA 16 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA - GENE DA LECITINA COM O PAR DE *PRIMER* GMO3/GMO4
 M: Marcador de peso molecular (100 pb), colunas 1-7: amostras de sementes de soja, C+: controle positivo, C-: controle negativo, Cext.: controle de extração de DNA, Cpcr: controle da PCR, a seta indica o peso molecular esperado

FONTE: O AUTOR (2012)

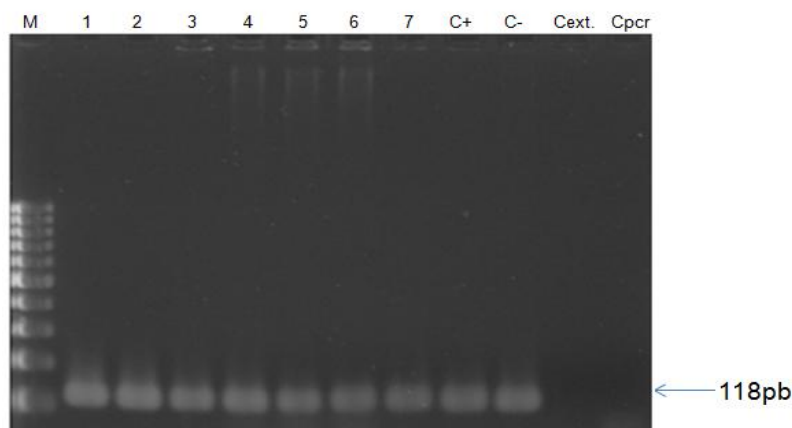


FIGURA 17 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE GRÃOS DE SOJA - GENE DA LECITINA COM O PAR DE *PRIMER* GMO3/GMO4
M: Marcador de peso molecular (100 pb), colunas 1-7: amostras de grãos de soja, C+: controle positivo, C-: controle negativo, Cext.: controle de extração de DNA, Cpcr: controle da PCR, a seta indica o peso molecular esperado
FONTE: O AUTOR (2012)

É possível observar que em algumas amostras, tanto de sementes como de grãos de soja, o aparecimento de arraste. Este efeito é indicativo de DNA bastante concentrado na amostra e para minimizar ou eliminá-lo, faz-se necessário a aplicação de diluições do DNA.

Estes resultados são corroborados por estudos realizados por CARDARELLI *et al.*, (2005); GREINER *et al.*, (2005); AJDUKOVIC *et al.*, (2009); FERREIRA *et al.*, 2009; NIKOLIC *et al.*, (2009); LI *et al.*, (2011); TIAN *et al.*, (2011), onde foi amplificado um fragmento de 118 pb na detecção de espécie específica da soja, numa pesquisa em que foram utilizadas amostras de soja crua, folhas de soja, produtos alimentares processados contendo na sua composição soja e milho e ração contendo soja.

A detecção de OGM torna-se mais precisa e confiável quando é usado um gene de referência. Para ser utilizado como referência endógena, o gene deve obedecer as seguintes necessidades: ser espécie-específico, apresentar baixo número de cópias no genoma e exibir baixa heterogeneidade entre cultivares (MARCELINO *et al.*, 2007; CHAOUACHI *et al.*, 2012).

Falhas na reação de PCR para amplificação da sequência de DNA alvo pode ser resultado de DNA degradado, DNA alvo insuficiente ou contaminação de DNA por inibidores (CARDARELLI *et al.*, 2005). Esta situação pode ser contornada com o uso de controles de amplificação representados por genes conservados de plastos ou genes específicos da soja que para além de evitar resultados falso-positivos, avaliam

a qualidade de DNA extraído (TUNG NGUYEN *et al.*, 2008a; FERRERIRA *et al.*, 2009; AJDUKOVIC *et al.*, 2009; DINON *et al.*, 2010).

5.2.2 Amplificação do gene transgênico (*Roundup Ready Soybean*[®])

Existem dois tipos diferentes de PCR que podem ser distinguidos, o sistema de rastreamento e o sistema específico. O sistema de rastreamento, que não é específico para a detecção de um organismo geneticamente modificado particular, usa comumente, elementos de engenharia genética como, o promotor 35S da *CaMV*, o terminador *nos* da *Agrobacterium tumefaciens* ou o gene marcador com resistência a canamicina (*nptII*) (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006; TUNG NGUYEN *et al.*, 2008a; NIKOLIC *et al.*, 2009; WAIBLINGER *et al.*, 2010), visto que muitos dos OGMs atualmente disponíveis no mundo contêm um dos três elementos genéticos (TUNG NGUYEN *et al.*, 2008).

Já o sistema altamente específico pode detectar somente um OGM particular (ABDULLAH *et al.*, 2006; NIKOLIC *et al.*, 2009). Desta feita, as amostras primeiramente submetidas a amplificação do gene da lecitina e que apresentaram resultado positivo foram analisadas para a detecção específica do gene RRS com os *primers* p35S-f2/petu-r1 (GREINER & KONIETZY, 2008). Todas as amostras independentemente do número de sementes RR usadas como contaminantes incluindo o controle positivo de transgenia apresentaram um fragmento de 172 pb na electroforese em gel de agarose a 1,5% (FIGURAS 18 e 19), confirmando a presença de material geneticamente modificado nas mesmas. O controle negativo apresentou, como esperado, ausência de transgenia, não amplificando o fragmento do gene CP4 EPSPS.

Os controles de extração de DNA e de PCR, mais uma vez não apresentaram bandas, fato este que comprova a não contaminação tanto no processo de extração quanto na PCR.

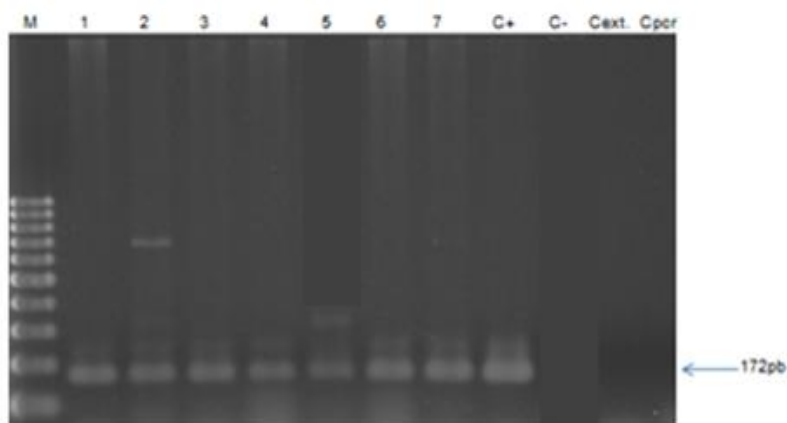


FIGURA 18 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA – GENE RR COM O PAR DE *PRIMER* p35S-f2/petu-r1

M: Marcador de peso molecular (100 pb), colunas 1-7: amostras de sementes de soja, C+: controle positivo, C-: controle negativo, Cext.: controle de extração, Cpcr: controle da PCR, a seta indica o peso molecular esperado

FONTE: O AUTOR (2012)

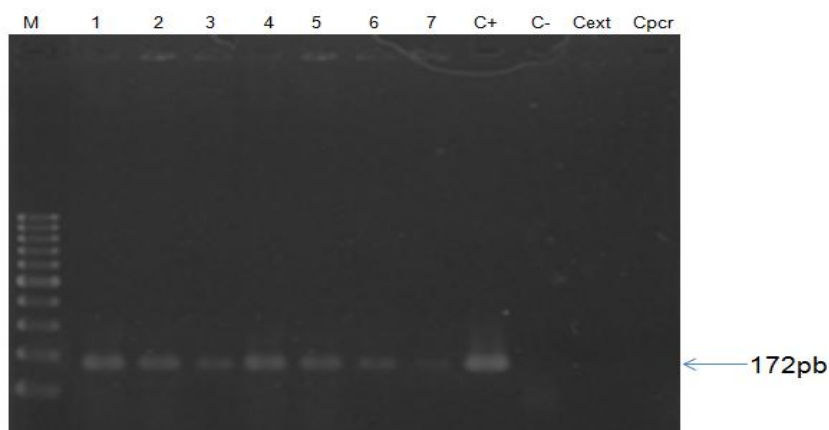


FIGURA 19 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE GRÃOS DE SOJA - GENE RR COM O PAR DE *PRIMER* p35S-f2/petu-r1

M: Marcador de peso molecular (100 pb), colunas 1-7: amostras de grãos de soja, C+: controle positivo, C-: controle negativo, Cext.: controle de extração, Cpcr: controle da PCR, a seta indica o peso molecular esperado

FONTE: O AUTOR (2012)

Pode-se observar nas amostras 2 e 5 de sementes de soja (FIGURA 18), a presença de mais de uma banda na eletroforese em gel de agarose. Este pode provavelmente ser indicativo de DNA degradado, excesso de DNA, excesso de *primers* na reação ou ainda tempo longo na etapa de extensão. Este resultado é corroborado por estudo realizado por CHEN *et al.*, (2005); em que foi estudada a degradação de genes endógeno e exógeno da soja *Roundup Ready*[®] durante o processamento de alimentos.

Durante o processamento da farinha de soja, os processos mecânicos de trituração e homogeneização tem o maior efeito na degradação tanto do gene endógeno lecitina quanto do DNA exógeno EPEPS. Porém, os graus do efeito são muito diferentes para estes dois genes, não afetando significativamente o gene endógeno lecitina e tendo efeito significativo na degradação do gene exógeno EPSPS (CHEN *et al.*, 2005).

5.3 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

Embora as características mais marcantes do método de detecção de organismos transgênicos baseado na reação de PCR convencional sejam a sua precisão e sua sensibilidade, o método é incapaz de fornecer informação acurada sobre a quantidade do alvo a ser amplificado. Isto se deve às oscilações na eficiência de amplificação em diferentes reações, bem como nos diferentes ciclos de uma mesma reação (MARCELINO *et al.*, 2007). Por esta razão, após terem sido analisadas por PCR convencional, as amostras de sementes e grãos de soja foram submetidas à amplificação por PCR em tempo real do gene da lecitina da soja e do gene RR.

Além de a quantidade e qualidade de DNA extraído serem fundamentais para uma quantificação confiável, a eficiência da reação de PCR em tempo real é um parâmetro crucial na confiabilidade dos resultados quantitativos.

Estas variações estão relacionadas com o acúmulo de inibidores, perda da processividade da enzima DNA polimerase e escassez dos reagentes ao longo dos ciclos. Em especial, nos últimos ciclos da PCR, os produtos de amplificação são produzidos de modo não exponencial, o que torna inviável a correlação da quantidade inicial de alvo com a quantidade de alvo amplificada no decorrer dos ciclos (MARCELINO *et al.*, 2007).

Diferentemente da PCR convencional, que fornece um resultado visual do ponto final da reação (presença ou ausência do produto de PCR amplificado) a PCR em tempo real permite, além da visualização da curva de amplificação, a obtenção de valores numéricos de Ct, ou seja, do primeiro ciclo onde o sistema diferencia o sinal de amplificação do ruído da reação (BERDAL e HOLSTEN-JENSEN, 2001; YANG *et al.*, 2005b).

As TABELAS 2 e 3 indicam os valores de Ct dos genes de referência e RR obtidos a partir dos *kits* SYBR Green (Thermo Scientific) e *Mericon Assay* (Quiagen), e o número de cópias dos genes alvo, obtidos a partir de *Mericon Assay*.

TABELA 2 - DADOS DE Ct E NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES DA LECITINA E RR, OBTIDOS DAS SEMENTES DE SOJA POR PCR EM TEMPO REAL

Amostras	Mericon Assay				SYBR Green	
	Lecitina		RRS		Lecitina	RRS
	Ct médio	Número de cópias	Ct médio	Número de cópias	Ct médio	Ct médio
STD 1	21.589	81.920	28.721	10.420	–	–
STD 2	24.565	10.420	31.008	1280	–	–
STD 3	27.22	1280	33.727	160	–	–
STD 4	30.64	160	37.949	20	–	–
C+	25.242	3,082.271	36.034	25.813	19.366	25.433
C-	–	–	–	–	–	–
SS2	25.389	2,090.444	36.314	1.50	24.907	34.782
SS3	25.027	3,073.221	35.5	2.17	24.125	33.81
SS5	24.052	4,683.718	35.364	464	23.987	33.207
SS6	22.907	4,806.966	35.221	544	23.26	32.555
SS9	22.202	5,948.167	34.901	5.444	23.031	32.075
SS10	22.187	10,161.592	33.793	15.311	22.967	31.64
SS15	21.33	25,345.625	33.585	119.285	21.255	28.515
SS20	21.138	67,879.562	32.063	567.975	21.076	27.858

TABELA 3 - DADOS DE Ct E NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES DA LECITINA E RR, OBTIDOS DOS GRÃOS DE SOJA POR PCR EM TEMPO REAL

Amostras	Mericon Assay				SYBR Green	
	Lecitina		RRS		Lecitina	RRS
	Ct médio	Número de cópias	Ct médio	Número de cópias	Ct médio	Ct médio
STD 1	22.93	81.920	28.733	10.420	–	–
STD 2	25.816	10.420	31.737	1280	–	–
STD 3	28.897	1280	34.564	160	–	–
STD 4	32.034	160	37.888	20	–	–
C+	26.427	3,207.507	37.907	25.813	19.951	23.977
C-	–	–	–	–	–	–
Cc 1	27.572	2,090.444	40	32.65	25.886	35.148
Cc 2	27.092	3,073.221	40	51.19	25.866	34.902
Cc 3	26.702	4,683.718	38.816	65.051	25.252	32.952
Cc 5	26.461	4,806.966	37.227	75.810	23.989	32.346
Cc 10	26.136	10,161.592	36.725	233.918	23.953	31.094
Cc 11	25.294	10,345.625	30.934	468.491	23.611	30.553
Cc 13	21.087	120,345.625	30.712	993.081	22.147	27.243
Cc 14	20.488	159,835.344	28.389	1,430.225	22.123	22.575

Segundo HUBNER *et al.*, (2001), especificidade de um método é definida como sendo a habilidade do método em detectar uma substância sem interferência de outros componentes presentes na amostra.

Um método específico não deve produzir sinais de amplificação com sequências alvo diferentes dos alvos para os quais o método foi desenvolvido. Na detecção de eventos geneticamente modificados, o alvo deve ser evento específico (ENGL, 2008). Assim, métodos de PCR quantitativo para análise de alimentos GM devem ser altamente específicos.

5.3.1 Avaliação da sensibilidade e especificidade por PCR em tempo real pelo *kit Mericon Assay*

Reações de amplificação do DNA extraído das sementes e grãos de soja contendo diferentes quantidades de soja geneticamente modificada foram realizadas para amplificação da lecitina. As diferentes amostras amplificaram entre os Cts médios de 21 (20) e 25 (2) para as sementes, e 20 (14) e 28 (1) para os grãos de soja (FIGURAS 20, 21), indicando alta sensibilidade do sistema na amplificação do gene endógeno da soja. O controle negativo que era constituído somente pela mistura de PCR não apresentou amplificação até o Ct 45, confirmando a maior especificidade do sistema .

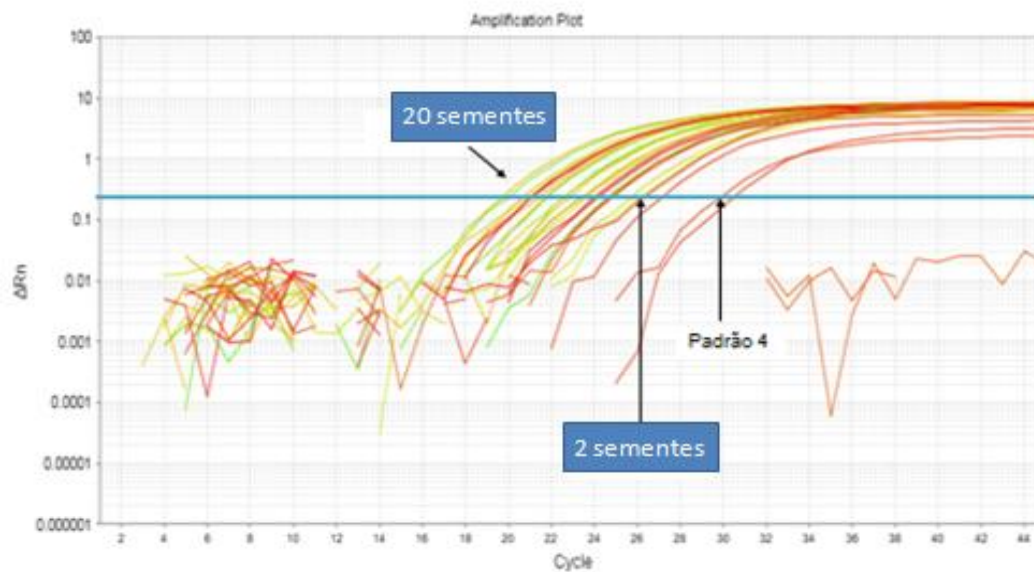


FIGURA 20 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE LECITINA EM SEMENTES DE SOJA PELO KIT *MERICON ASSAY*

FONTE: O AUTOR (2012)

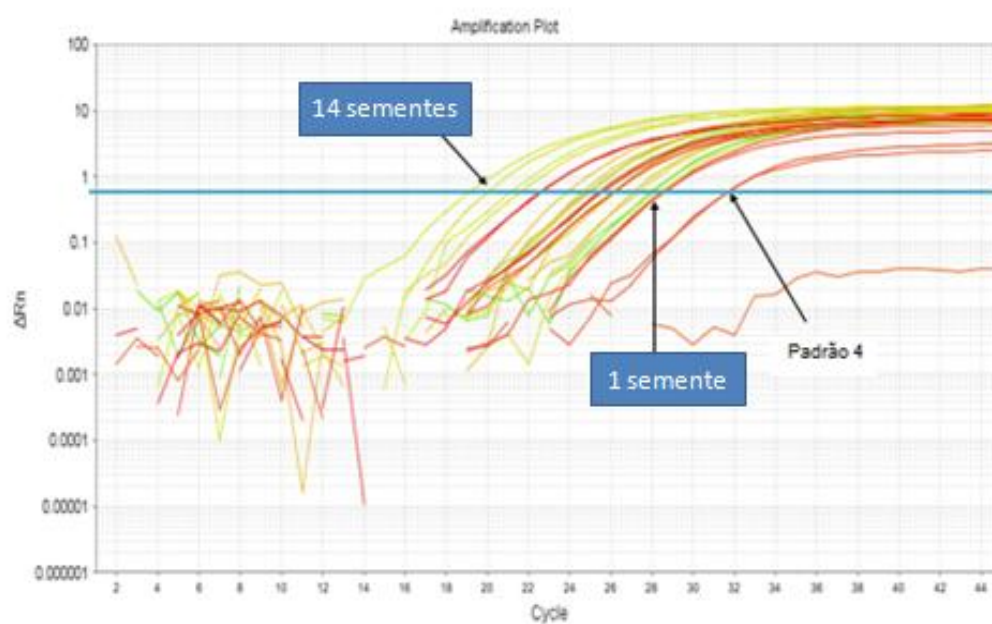


FIGURA 21 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE LECITINA EM GRÃOS DE SOJA PELO KIT *MERICON ASSAY*

FONTE: O AUTOR (2012)

As diferentes quantidades de soja GM foram amplificadas entre os Cts médios de 32 (20) e 36 (2) para as sementes e 28 (14) e 40 (1) para os grãos de soja (FIGURAS 22, 23), indicando alta especificidade do sistema na detecção de uma

semente de soja RR[®] numa mistura intencional de sementes e grãos não GM, porém baixa sensibilidade do sistema na amplificação de concentrações menores de soja RR[®]. O controle negativo não apresentou amplificação até o Ct 45.

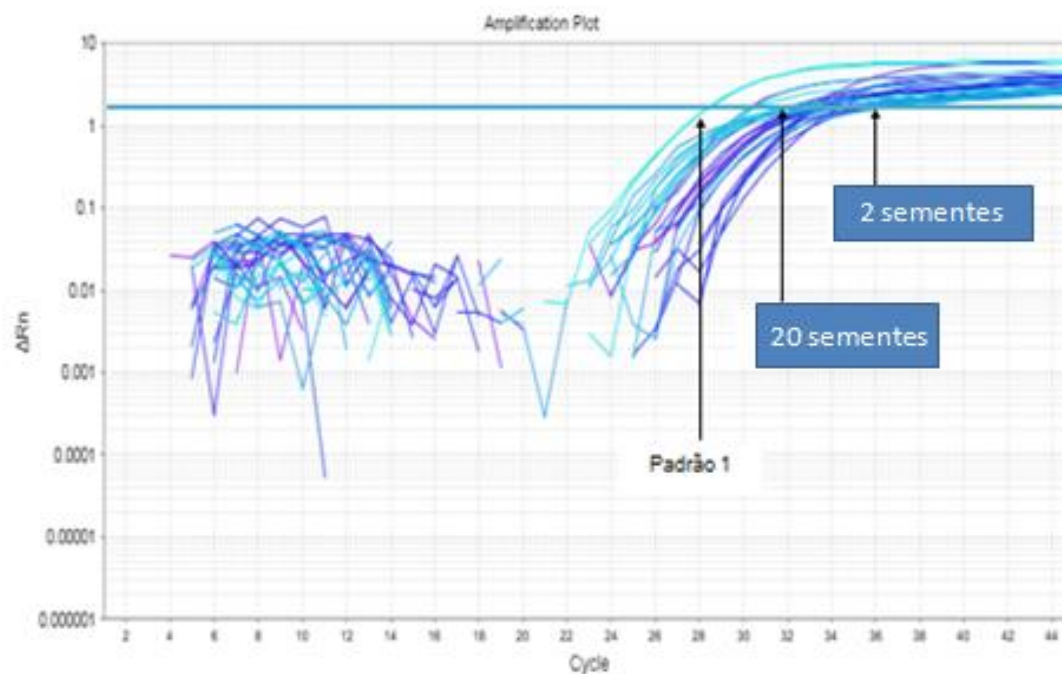


FIGURA 22 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE RR[®] EM SEMENTES DE SOJA PELO *KIT MERICON ASSAY*

FONTE: O AUTOR (2012)

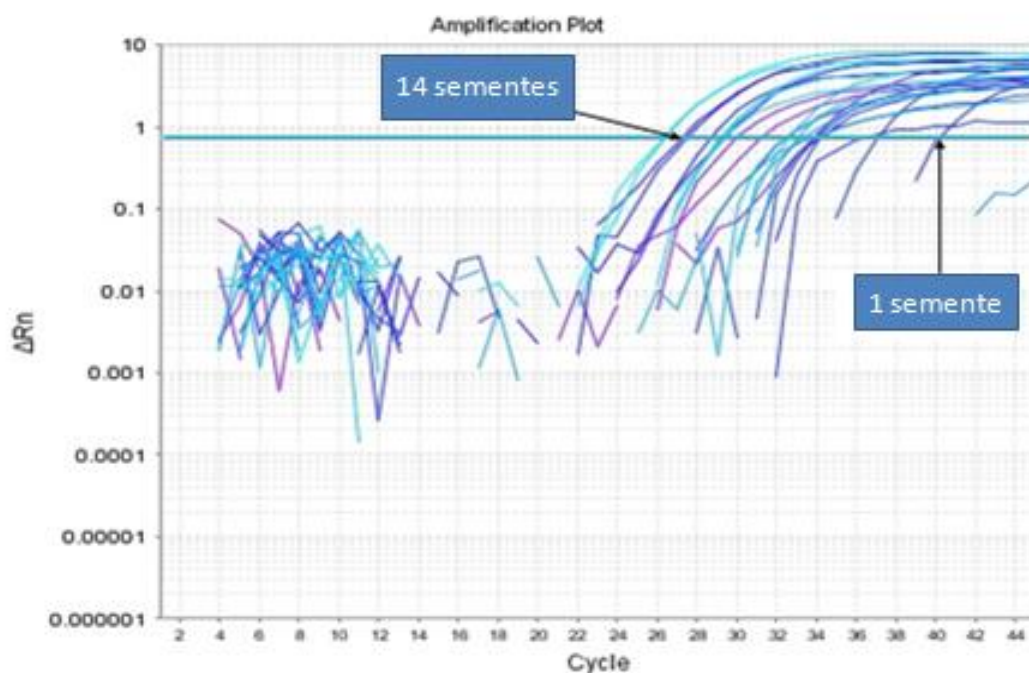


FIGURA 23 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE RR[®] EM GRÃOS DE SOJA PELO KIT *MERICON ASSAY*
 FONTE: O AUTOR (2012)

5.3.2 Avaliação da sensibilidade e especificidade por PCR em tempo real pelo kit SYBR Green

Foram também realizadas reações de PCR em tempo real do DNA extraído das sementes e de grãos de soja com o sistema SYBR Green para lecitina. O gene endógeno da soja foi amplificado entre os Cts médios de 25 (20) e 21 (2) para as sementes e 26 (14) e 22 (1) para os grãos de soja (FIGURAS 24, 25), resultados estes compatíveis com o kit *Mericon Assay*, o que demonstra sensibilidade do sistema. O controle negativo não apresentou amplificação.

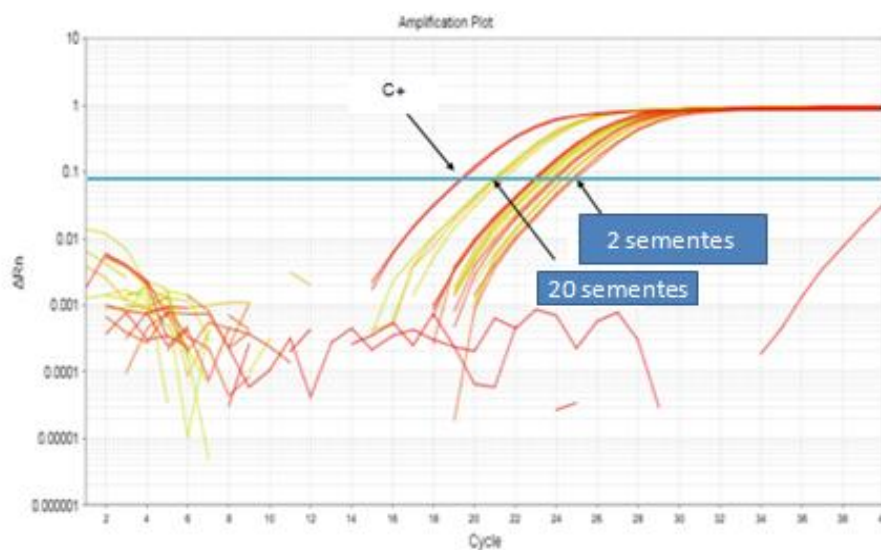


FIGURA 24 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE LECITINA EM SEMENTES DE SOJA PELO KIT SYBR GREEN

FONTE: O AUTOR (2012)

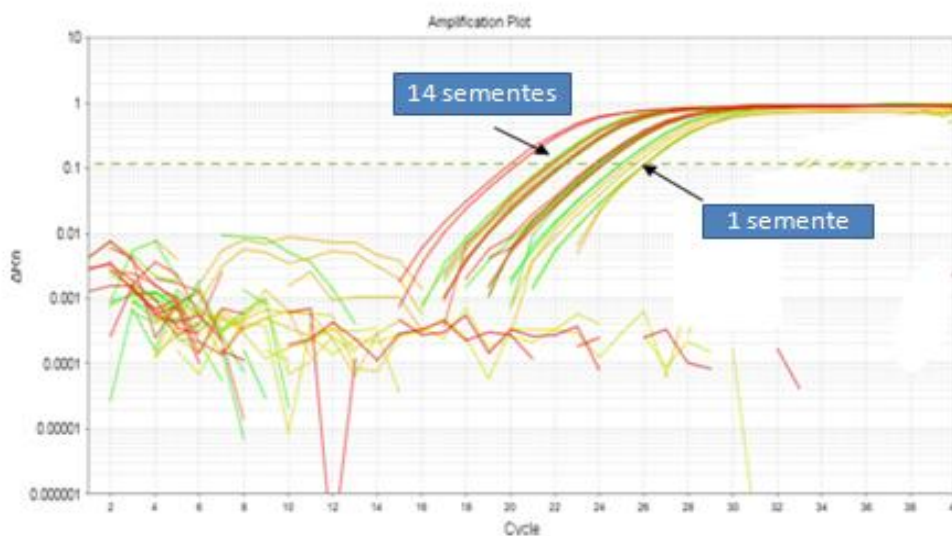


FIGURA 25 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE LECITINA EM GRÃOS DE SOJA PELO KIT SYBR GREEN

FONTE: O AUTOR (2012)

As mesmas amostras foram testadas para amplificação de diferentes concentrações de soja RR[®] e os valores de Cts médios apresentaram-se entre 28 (20) e 35 (2) para as sementes e 23 (14) e 35 (1) para os grãos de soja (FIGURAS 26, 27), indicando igualmente alta especificidade do sistema na detecção de uma

semente de soja RR[®] numa mistura intencional em grãos de soja não GM. O controle negativo não apresentou amplificação até o Ct 45. Estes resultados confirmam os resultados obtidos pelo *kit Mericon Assay*.

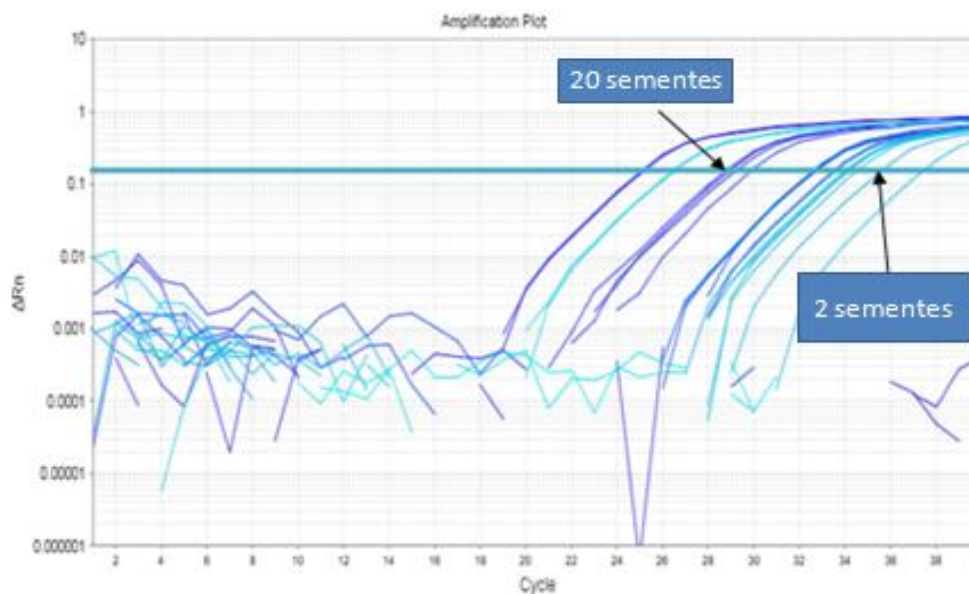


FIGURA 26 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE RR[®] EM SEMENTES DE SOJA PELO *KIT SYBR GREEN*

FONTE: O AUTOR (2012)

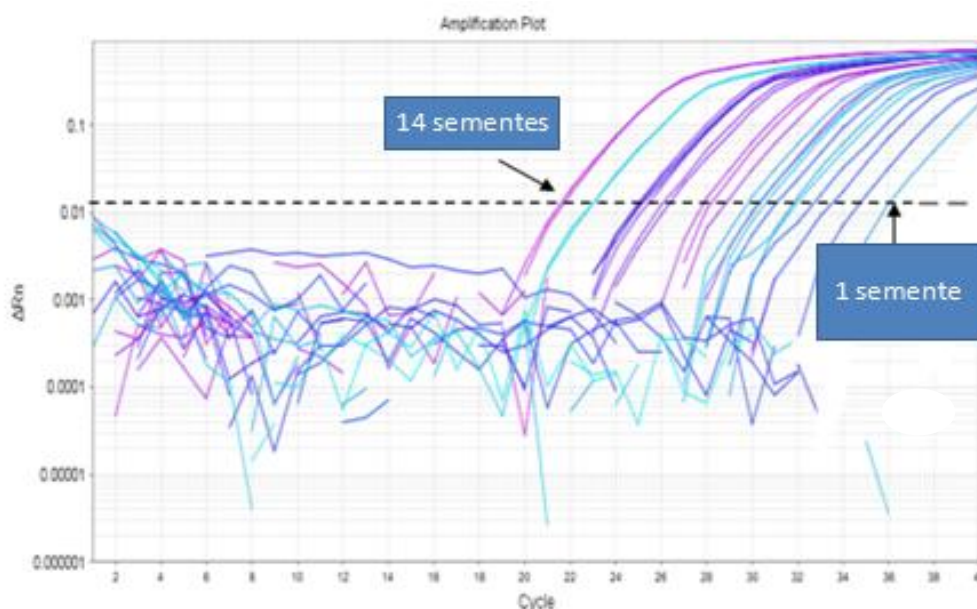


FIGURA 27 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE RR[®] EM GRÃOS DE SOJA PELO *KIT SYBR GREEN*

FONTE: O AUTOR (2012)

Os gráficos gerados durante a reação foram traçados a partir da amplificação do sinal fluorescente após cada ciclo da PCR. A intensidade do sinal gerado reflete a quantidade de produto formado. O ciclo onde o sinal de amplificação exponencial atingiu uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (Ct) foi estabelecido. As diferenças nos valores dos Cts observados nos dois sistemas de detecção em estudo, estão relacionadas com as diferentes quantidades de DNA alvo, demonstrando uma relação direta entre concentração de DNA e Ct.

Na amplificação do RR[®] nos dois sistemas utilizados, os valores de Ct foram altos devido, provavelmente, ao baixo número de cópias alvo por reação, comparando com a lecitina que apresentava números de cópias alvo maior. Esta situação é suportada por KUBISTA *et al.*, (2006) que afirmam que quanto maior a quantidade de DNA, menor o valor de Ct, menos ciclos de amplificação são necessários para atingir o limite de detecção.

Os altos valores de Ct observados em algumas amostras podem também sugerir que o processo mecânico de extração do DNA, a que as amostras foram submetidas, tenha tido impacto no perfil de amplificação do DNA. A fragmentação do DNA durante a trituração das amostras pode ser crítica para a amplificação por PCR em tempo real e conseqüentemente para a quantificação de ingredientes transgênicos. As variações altas observadas são similares as observadas por CANKAR *et al.*, (2006) onde foram obtidos valores altos de Ct em alimentos processados comparando com o material de referência devido a baixa quantidade de DNA isolada dessas amostras de alimentos.

Os valores de ΔCt foram calculados a partir da diferença entre os Cts obtidos na amplificação do RR e os obtidos na amplificação da lecitina. Estes valores se situaram entre 11,0 nas sementes e 1,0 e 14,0 nos grãos utilizando o *kit Mericon Assay* e entre 7,0 e 10,0 nas sementes e 1,0 e 9,0 nos grãos utilizando o SYBR Green. Estes valores são indicativos de presença de substâncias inibidoras nas soluções de DNA, uma vez que o aceitável seria de 0,5 (ENGL, 2008).

Os parâmetros coeficiente de correlação R^2 , coeficiente angular e eficiência da reação obtidos do *kit Mericon Assay* estão demonstrados na TABELA 5. Os valores do coeficiente de correlação R^2 ficaram acima de 0,98 para lecitina, demonstrando proporcionalidade entre o número de cópias e os Cts. Em relação à amplificação do RR, o coeficiente ficou abaixo de 0,98 demonstrando menor

correlação. Neste caso, a possível presença de impurezas pode ter prejudicado a amplificação do alvo RR.

O coeficiente angular (inclinação da reta) indica a eficiência da amplificação para os dois alvos e o valor ótimo de $-3,324$ corresponde a 100% de eficiência. Nas corridas feitas o valor esteve dentro do padrão aceitável o que corresponde de 98% a 100% de eficiência. Esses valores são similares aos observados por CANKAR *et al.*, (2006) e encontram-se dentro do aceitável pelo European Network of GMO Laboratories (ENGL) (2008), em que nos critérios de aceitação, a inclinação deve estar entre $-3,1$ e $-3,6$, ou seja, eficiência entre 90 e 110% e $R^2 \geq 0,98$.

TABELA 4 - PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS NA QUANTIFICAÇÃO DE OGMs PELO KIT MERICON ASSAY

Gene	Sementes de soja			Grãos de soja		
	Coeficiente de correlação (R2)	Coeficiente angular (inclinação da reta)	Eficiência	Coeficiente de correlação (R2)	Coeficiente angular (inclinação da reta)	Eficiência
Lecitina	0,992	-3,3	100%	0,999	-3,365	98,22%
RRS	0,952	-3,367	98%	0,965	-3,354	98,67%

FONTE: O AUTOR (2012)

As amostras de sementes e grãos de soja contaminadas intencionalmente, foram quantificadas e os resultados expressos em termos de conteúdo de OGM conforme a TABELA 6. Os resultados mostraram que a presença de sementes de soja geneticamente modificada, independentemente da quantidade, foi capaz de ser detectada pela metodologia proposta.

TABELA 5 - QUANTIFICAÇÃO DE OGMs PELO KIT MERICON ASSAY

Amostra	% OGM	Amostra	% OGM
Sementes de soja		Grãos de soja	
C+	0,99	C+	0,99
SS2	0,007	Cc 1	0,1
SS3	0,007	Cc 2	0,1
SS5	0,009	Cc 3	1,3
SS6	0,01	Cc 5	1,5
SS9	0,09	Cc 10	2,3
SS10	0,2	Cc 11	4,5
SS15	0,5	Cc 13	8,2
SS20	0,8	Cc 14	8,9

FONTE: O AUTOR (2012)

As amostras de sementes e de grãos contaminada com 20 e 14 sementes de soja RR[®] respectivamente apresentaram a maior percentagem de OGM. Este fato pode ser justificado pelo fato de haver maior quantidade de gene transgênico nas mesmas. Esta situação foi observada no estudo realizado por PINTO *et al.*, (2011), onde pela PCR qualitativa as amostras de sementes e grãos contaminadas intencionalmente com a maior quantidade de soja RR[®] apresentaram bandas mais intensas.

Dos dois sistemas utilizados no estudo, o SYBR Green apesar de ser menos específico não apresentou resultados muito diferentes do *Mericon Assay*, mostrando-se sensível, eficiente e o fato de não usar sondas reduz o custo dos ensaios, tornando-se de eleição para trabalhos de rotina e prestação de serviço.

No Brasil, poucos estudos foram realizados para detectar e/ou quantificar a quantidade de material transgênico presente em alimentos processados (CARDARELLI *et al.*, 2005); (BROD *et al.*, 2007); (BROD & ARISI, 2008); (GREINER & KONIETZY, 2008); (BRANQUINHO, FERREIRA & CARDARELLI-LEITE, 2010), (DINON *et al.*, 2010) e (PINTO *et al.*, 2011). Esforços tem sido feitos pelas autoridades reguladoras para reforçar políticas de rotulagem. Programas de monitoramento foram estabelecidos para detectar e quantificar OGM presente em produtos alimentares, especialmente em estados com grandes quantidades de cultivo de soja.

O presente estudo foi realizado pois é sabido que o Brasil e, em particular o estado do Paraná, é o terceiro maior utilizador da biotecnologia na área agrícola. Considerando o aumento do cultivo de culturas geneticamente modificadas no país, torna-se necessário o uso de uma técnica de detecção eficiente, rápida e de custo acessível.

Com a introdução da regulação obrigatória de rotulagem de produtos alimentares GM, a demanda por testes laboratoriais para detecção e quantificação de OGM tem estado a aumentar. A PCR em tempo real utilizando o SYBR Green é um método ideal para o rastreamento de grãos e sementes de soja, transgênicos ou não, uma vez que a metodologia mostrou ser eficaz na detecção e quantificação de transgenia em amostras constituídas por soja convencional contaminadas por quantidades pequenas e conhecidas de soja RR[®].

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, pode-se concluir que o método CTAB mostrou-se adequado para a extração de DNA de sementes e grãos de soja. O DNA obtido foi de qualidade e com um grau de pureza aceitável. O método apesar de ser simples e de baixo custo, dura em torno de 8 horas para ser realizado, porém é uma boa escolha para análise de rotina em laboratórios de pequena a média infra-estrutura. Assim sendo, a escolha do método de extração de DNA deve tomar em consideração o seu custo e a sua rapidez.

A técnica de PCR convencional foi capaz de detectar a presença de OGM em 500g de sementes de soja convencional contaminado com duas sementes de soja RR[®] e em 100g de grãos de soja contaminados com apenas uma semente de soja RR[®].

Através dos dois tipos de fluoróforos foi possível amplificar o gene endógeno da soja e quantificar a presença de OGM em 500g de sementes de soja convencional contaminadas com duas sementes de soja RR[®] tendo resultado em 0,007% e em 100g de grãos de soja contaminados com apenas uma semente de soja RR[®] que foi obtido 0,1%.

A metodologia utilizando os dois fluoróforos mostrou-se confiável na detecção de soja RR[®], com nível de sensibilidade similar, uma vez que os resultados obtidos de Ct revelaram valores próximos.

Porém, apesar de ser menos específico que o *kit Mericon Assay*, o sistema SYBR Green foi capaz de detectar presença de OGM a um nível de sensibilidade próximo do *kit Mericon Assay*, demonstrando ser de eleição na rotina de laboratório e para trabalhos de prestação de serviços.

Com base nos resultados do presente trabalho, o método quantitativo PCR em tempo real constituirá uma nova opção para as empresas produtoras de sementes em relação ao uso de tiras de fluxo lateral, uma vez que esta última fornece resultado qualitativo. Este método auxiliará na detecção de sementes transgênicas em lotes de semente convencional, permitirá aos produtores selecionar e preservar variedades de soja não transgênica possibilitando a escolha dos mesmos sobre a adoção de plantação de soja GM.

Existindo também uma preocupação com a segurança do consumidor, motivada pela diversidade de produtos que vêm sendo desenvolvidos pela indústria de alimentos, a rotulagem de alimentos torna-se o principal meio de comunicação entre o produtor e o consumidor. A técnica também possibilitará a detecção e quantificação de soja geneticamente modificada aprovada no Brasil e facultará as autoridades competentes ferramentas para o rastreamento, identificação e controle de outros organismos geneticamente modificados, autorizados ou não, que possam estar presentes em lotes de semente convencional ou produtos alimentares comercializados no mercado Brasileiro, de modo a assegurar o cumprimento da lei existente.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma vez estabelecido o método quantitativo para detecção de soja geneticamente modificada em sementes plantadas e comercializadas no país, há necessidade de se estender a técnica para a análise de produtos alimentares processados, contendo na sua composição soja e que são comercializados no território Brasileiro.

Esta técnica auxiliará no cumprimento da legislação Brasileira que tem o limite máximo de transgenia estabelecido e a obrigatoriedade da rotulagem dos produtos se ultrapassado este limite, permitindo que o consumidor exerça o seu direito de escolha.

Esta abordagem torna-se necessária uma vez que resultados de estudos realizados no Brasil, detectaram soja e milho geneticamente modificados em matrizes e alimentos processados comercializados no país e alguns produtos por sua vez, apresentaram percentuais acima de 1% sem constar nenhuma informação no rótulo.

A técnica deve ser padronizada tanto para outras culturas e seus respectivos eventos quanto para os seus derivados, uma vez que o país não só aprovou a soja geneticamente modificada para o plantio, como também o milho, o algodão, a canola e outras.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, T.; RADU, S.; HASSAN, Z.; HASHIM, J. K. Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR – based method. **Food Chemistry**, v. 98, p. 575-579, 2006.

ADUGNA, A.; MESFIN, T. Detection and quantification of genetically engineered crops. **Journal of SAT Agricultural Research**, v. 6, 2008.

AERNI, P. Stakeholder attitudes towards the risks and benefits of genetically modified crops in South Africa. **Environmental Science and Policy**, v. 8, p. 464-476, 2005.

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

ALEXANDER, T. W.; REUTER, T.; AULRICH, K.; SHARMA, R.; OKINE, E. K.; DIXON, W. T.; McALLISTER, T. A. A review of the detection and fate on novel plant molecules derived from biotechnology in livestock production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 133, p. 31-62, 2007.

ALVES, G. S. A biotecnologia dos transgênicos: Precaução é a palavra de ordem. *Holos*, Ano 20, Outubro/2004.

AMÂNCIO, M. C. Marco legal brasileiro sobre organismos geneticamente modificados. **Ministério da Saúde, Organização PAN-Americana da Saúde**, 1.^a edição, p. 209-211, Brasília, DF, 2010.

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

ANKLAM, E.; GADAMI, F.; HEINZE, P.; PIJNENBURG, H.; VAN DEN EEDE, G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 3-26, 2002.

ARIAS, C. A. A. (2004). Soja transgênica: experiências de pesquisa e produção. Disponível em: <<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc-2001/talleres/w-3/carlos%20arrabal/redbio.pdf>>. Acesso em: 07/2010.

ARRIEL, N. H. C.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; CAPELOTO, A.; DI MAURO, S. M. Z.; DI MAURO, A. O. Análise comparativa de quatro protocolos de extração de DNA genômico, em gergelim. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 6, n. 2, p. 525-535, 2002.

ASENSIO, L.; GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Food Control**, v. 19, p. 1-8, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MILHO (ABRAMILHO). Disponível em: <<http://www.abramilho.org.br/noticias.php?cod=1405>>. Acesso em: 07/2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE SEMENTES (ABRATES). Disponível em: <<http://www.abrates.org.br/portal/noticias/132-brasil-tem-novo-recorde-na-adocao-de-lavouras-transgenicas>>. Acesso em: 07/2012.

ASURAGEN. AB TaqMan® gene expression services. Disponível em: <http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx>. Acesso em: 10/2012.

BARROS, L. M. G.; VIANA, A. A. B.; CARNEIRO, M. Aprendendo com as Agrobactérias. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 32, p. 15-27, 2004.

BARROS, N. E. F.; OLIVEIRA, E. M. M.; MARIN, V. A. Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 1, p. 85-92, 2008.

BATTISTINI, E.; NOLI, E. Real-time quantification of wild-type contaminants in glyphosate tolerant soybean. **BioMed Central Biotechnology**, v. 9, n. 16, p. 1-10, 2009.

BERDAL, K. G.; HOLST-JENSEN, A. Roundup ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. **European Food Research and Technology**, v. 213, p. 432-438, 2001.

BERVALD, C. M. P.; MENDES, C. R.; TIMM, F. C.; DE MORAES, D. M.; BARROS, A. C. S. A.; PESKE, S. T. Desempenho fisiológico de sementes de soja de cultivares convencional e transgênico submetida ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 9-18, 2010.

BIOSEARCH TECHNOLOGIES. Dyes & fluorescence detection chemistry in qPCR. Disponível em: <<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>>. Acesso em: 10/2012.

BONFINI, L.; HEINZE, P.; KAY, S.; VAN DEN EEDE, G. Review of GMO detection and quantification techniques. **European Commission**, Italy, 2001.

BRASIL. Decreto n° 4.680, de 24 de Abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei n° 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. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/d4680.htm>. Acesso em: 06/2012.

BRASIL. Lei de Biossegurança 11.105, de 24 de Março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1° 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. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2005. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=28/03/2005>>. Acesso em: 06/2012.

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

BROD, F. C. A.; FERRARI, C. S.; VALENTE, L. L.; ARISI, A. C. M. Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, p. 748-751, 2007.

CANKAR, K.; STEBIH, D.; DREO, T.; ZEL, J.; GRUDEN, K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **BioMed Central Biotechnology**, v. 6, p. 37, 2006.

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

CENTRO DE INFORMAÇÃO DE BIOTECNOLOGIA (CIB). Disponível em: <<http://cibpt.org/inicio/index.php/cib/comunicados/2012/138-culturas-transgenicas-no-mundo-16-7-milhoes-de-agricultores-cultivaram-mais-8-em-2011>>. Acesso em: 07/2012.

CHAOUACHI, M.; ALAYA, A.; ALI, I. B. H.; HAFSA, A. B.; NABI, N.; BÉRARD, A.; ROMANIUK, M.; SKHIRI, F.; SAID, K. Development of real-time PCR method for the detection and the quantification of a new endogenous reference gene in sugar beet "*Beta vulgaris* L.": GMO application. **Plant Cell Reports**, 2012.

CHEN, Y.; WANG, Y.; GE, Y.; XU, B. Degradation of endogenous and exogenous genes of roundup-ready soybean during food processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 10239-10243, 2005.

CHILTON, M. D.; DRUMMOND, M. H.; MERLO, D. J.; SCIAKY, D.; MONTOYA, A. L.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, v. 11, p. 263-271, 1977.

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

CORBISIER, P.; TRAPMANN, S.; GANCSBERG, D.; HANNES, L.; VAN IWAARDEN, P.; BERBEN, G.; SCHIMMEL, H.; EMONS, H. Quantitative determination of roundup ready soybean (*Glycine max*) extracted from highly processed flour. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, p. 282-290, 2005.

COSTA, T. E. M. M.; MARIN, V. A. Rotulagem de alimentos que contém organismos geneticamente modificados: políticas internacionais e legislação no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 8, p. 3571-3582, 2011.

CRESPO, M. T. B.; PERES, C. M.; PEREIRA, C. I.; RODRIGUES, F. S. Detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Boletim de Biotecnologia**, n. 69, p. 33-37, 2001.

CROMWELL, G. L.; LINDEMANN, M. D.; RANDOLPH, J. H.; PARKER, G. R.; COFFEY, R. D.; LAURENT, K. M.; ARMOSTRONG, C. L.; MIKEL, W. B.; STANISIEWSKI, E. P.; HARTNELL, G. F. Soybean meal from roundup ready or conventional soybeans in diets for growing-finishing swine. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 3, p. 708-715, 2002.

CUNHA, C. S. M.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA, F. A.; DODE, L. B.; BALERINI, F. Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 167- 175, 2005.

DE ANDRADE, S. R. M. Transformação de plantas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ISSN 1517-5111, Planaltina-DF, p. 10-21, 2003.

DEMEKE, T.; JENKINS, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 1977-1990, 2010.

DE MIRANDA, D. M.; TILLMANN, M. A. A.; BALERINI, F.; VILLELA, F. A. Bioensaio na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n.1, p. 93-103, 2005.

DILL, G. M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. **Pest Management Science**, v. 64, p. 219-224, 2005.

DINON, A. Z.; TREML, D.; de MELLO, C. S.; ARISI, A. C. M. Monitoring of GMO in Brazilian processed meat and soy-based products from 2007 to 2008. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 226-229, 2010.

DUIJN, G. V.; BIERT, R. v.; BLEEKER-MARCELIS, H.; PEPPELMAN, M. H. Detection methods for genetically modified crops. **Food Control**, v. 10, p. 375-378, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/marco/2a-semana/adocao-do-milho-transgenico-no-brasil-e-tema-de-debates/>>. Acesso em: 07/2012.

EUROFINS GENESCAN. GMO Quant roundup ready™ soy. Test kit for quantification of roundup ready™ soy DNA, v. 20, 2007.

EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing, **Community Reference Laboratory**, p.8, 2008.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EC) No 49/2000 of 10 January 2000 amending Council Regulation (EC) No 1139/98 concerning the compulsory indication on the labeling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. **Official Journal of the European Communities**, L 006, p. 13-14, 2000. Disponível em: <http://www.biosafety.be/PDF/49_2000.pdf>. Acesso em: 06/2012.

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

GACHET, E.; MARTIN, G. G.; VIGNEAU, F.; MEYER, G. Detection of genetically modified organism (OGMs) by PCR. **A brief review of methodology available**, v. 9, p. 380-388, 1999.

GARCÍA, P. R. Directive 2001/18/EC on the Deliberate release into the environment of GMO: an overview and the main provisions for placing on the market. **Journal for European Environmental & Planning Law**, v. 3, n. 1, p. 3-12, 2006.

GASPARIC, M. B.; TENGS, T.; LA PAZ, J. L.; HOLST-JENSEN, A.; PLA, M.; ESTEVE, T.; ZEL, J.; GRUDEN, K. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2023-2029, 2010.

GEORGE, R. Polymerase chain reaction (PCR). Microbial Life - Education Resource. Montana State University. Disponível em: <http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/pcr.html>. Acesso em: 09/2012.

GERDES, L.; BUSCH, U.; PECORARO, S. Parallelised real-time PCR for identification of maize GMO events. **European Food Research and Technology**, v. 234, p. 315-322, 2012.

GIBBS, R. A. DNA amplification by the polymerase chain reaction. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 1202-1214, 1990.

GILBERT, J. Sampling of raw materials and processed foods for the presence of GMOs. **Food Control**, v. 10, p. 363-365, 1999.

GREEN, J. M.; OWEN, M. D. K. Herbicide-Resistant Crops: Utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5819-5829, 2011.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed food sold commercially in Brazil by PCR-based methods. **Food Control**, v. 16, p. 753-759, 2005a.

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, 2008b.

GRIFFITHS, K.; PARTIS, L.; CROAN, D.; WANG, N.; EMSLIE, K. R. Review of technologies for detecting genetically modified materials in commodities and food. **Australian Government Analytical Laboratories**, Australia, 2000.

GRYSON, N.; MESSENS, K.; DEWETTINCK, K. Evaluation and optimization of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1357-1363, 2004.

GUERRANTE, R. S. **Estratégia de inovação e tecnologia em sementes**. Tese de Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011. 86 p. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/81758040/Tese-Doutorado-Rafaela-Guerrante>>. Acesso em: 07/2012.

GUSTAFSON, D. I. Sustainable use of glyphosate in North American cropping systems. **Pest Management Science**, v. 64, p. 409-416, 2008.

HARRIER, L. A.; MILLAM, S. Biolistic transformation of arbuscular mycorrhizal fungi. **Molecular Biotechnology**, v. 18, 2001.

HEID, C.A.; STEVES, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HEINZ, R.; NETO, A. L. V.; VALENTE, T. O. Detecção de sementes de soja geneticamente modificada por meio de teste de germinação. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 11, p. 20-26, 2011.

HOLST-JENSEN, A.; RONNING, S. B.; LOVSETH, A.; BERDAL, K. G. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 985-993, 2003.

HUBNER, P.; STUDER, E.; LUTHY, J. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. **Food Control**, v. 10, p. 353-358, 1999.

HUBNER, P.; WAIBLINGER, H. U.; PIETSCH, K.; BRODMANN, P. Validation of PCR methods for quantification of genetically modified plants in food. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists International**, v. 84, n. 6, p. 1855-1864, 2001.

HUGGETT, A. C.; CONZELMANN, C. EU regulation on novel foods: Consequences for the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, 1997.

HUPFER, C.; HOTZEL, H.; SACHSE, K.; ENGEL, K. H. Detection of the genetic modification in heat-treated products from Bt maize by polymerase chain reaction. **Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung and Forschung**, v. 206, p. 203-206, 1998.

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.

IBA-Solutions for life sciences. Real-time PCR (qPCR) probes. Disponível em: <http://www.iba-lifesciences.com/Services_custom_oligos_custom_DNa_Fluorescent_label_Real-time_PCR_probes.html>. Acesso em 09/2012.

JACCAUD, E.; HOHNE, M.; MEYER, R. Assessment of screening methods for the identification of genetically modified potatoes in raw materials and finished products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 550-557, 2003.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2011. **ISAAA Briefs**, n. 43, Ithaca, NY, 2011. Disponível em: <<http://www.isaaa.org>>. Acesso em: 06/2012.

KAKIHARA, Y.; MATSUFUGI, H.; CHINO, M.; TAKEDA, M. Extraction and detection of endogenous soybean DNA from fermented foods, **Food Control**, v. 17, p. 808-813, 2006.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125, 2006.

LA PAZ, J. L.; ESTEVE, T.; PLA, M. Comparison of real-time PCR detection chemistries and cycling modes using Mon810 event-specific assays as model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4312-4318, 2007.

LEE, S. H.; MIN, D. M., KIM, J. K. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction analysis for genetically modified maize MON863. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1124-1129, 2006.

LI, X.; PAN, L.; LI, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, S.; LV, R.; YANG, L. Establishment and application of event-specific polymerase chain reaction methods for two genetically modified soybean events, A2704-12 and A5547-127. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 13188-13194, 2011.

LIPP, M.; BRODMANN, P. PIETSCH, K.; PAUWELS, J.; ANKLAM, E.; BORCHERS, T.; BRAUNSCHWEIGER, G.; BUSCH, H.; EKLUND, E.; ERIKSEN, F. D.; FAGAN, J.; FELLINGER, A.; GAUGITSCH, H.; HAYES, D.; HERTEL, C.; HORTNER, H.; JOUDRIER, P.; KRUSE, L.; MEYER, R.; MIRAGLIA, M.; MULLER, W.; PHILLIPP, P.; POPPING, B.; RENTSCH, R.; WURTZ, A. A IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy bean and maize in dried powder. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists International**, v. 82, n. 4, p. 923-928, 1999a.

LIPP, M.; BLUTH, A.; EYQUEM, F.; KRUSE, L.; SCHIMMEL, H.; VAN DEN EEDE, G.; ANKLAM, E. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. **European Food Research and Technology**, v. 212, p. 497-504, 2001b.

LUTHY, J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. **Food Control**, v. 10, n. 6, p. 359-361, 1999.

MANO, J.; SHIGEMITSU, N.; FUTO, S.; AKIYAMA, H.; TESHIMA, R.; HINO, A.; FURUI, S.; KITTA, K. Real-Time PCR array as a universal platform for the detection of genetically modified crops and its application in identifying unapproved genetically

modified crops in Japan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 26-37, 2009.

MARCELINO, F. C.; MARTINS, M. F.; PIMENTA, M. A. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Detecção de resíduos de transgênicos em grãos e produtos derivados, A experiência da Universidade Federal de Viçosa. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 31, 2003.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; PAPATHOMA, A.; NERANTZIS, E.; BETZIOS, B.; DOURTOGLOU, V.; MONCANY, M. Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food. **Food Reviews International**, v. 20, n. 3, p. 275-296, 2004.

MARMIROLI, N.; MAESTRI, E.; GULLI, M.; MALCEVSCHI, A.; PEANO, C.; BORDONI.; DE BELLIS, G. Methods for detection of GMOs in food and feed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, p. 369-384, 2008.

MELO, M. R.; MARTINS, A. R.; BARBOSA, I. V.; ROMANO, P.; SHCOLNLK, W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 375-381, 2010.

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NINES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 314-319, 2001.

MATSUOKA, T.; KAWASHIMA, Y.; AKIYAMA, H.; MIURA, H.; GODA, Y.; SEBATA, T.; ISSHIKI, K.; TOYODA, M.; HINO, A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.40, p. 149-157, 1999.

MEYER, R.; CHARDONNENS, F.; HÜBNER, P.; LÜTHY, J. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products; **Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung and Forschung**, v. 203, n. 4, p. 339-344, 1996.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/pls/portal/!PORTAL.wwpob_page.show?_docname=1324452.PDF>. Acesso em: 07/2012.

MOCELLIN, S.; ROSSI, C. R.; PILATI, P.; NITTI, D.; MARINCOLA, F. M. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 5, p. 189-195, 2003.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NIKOLIC, Z.; TASKI-AJDUKOVIC, K.; TATIC, M.; BALESEVIC-TUBIC, S. Monitoring of the roundup-ready soybean in the Vojvodina province in Serbia. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 638-641, 2009.

NCBI. Real-time qRT-PCR. Probe reagents for functional genomics. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/IMG/PCR_plot.gif>. Acesso em: 09/2012.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real-Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, 2004.

OWEN, M. D. K.; ZELAYA, I, A. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. **Pest Management Science**, v. 61, p. 301-311, 2005.

PADGETTE, S. R.; TAYLOR, N. B.; NIDA, D. L.; BAILEY, M. R.; MacDONALD, J.; HOLDEN, L. R.; FUCHS, R. L. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. **Journal of Nutrition**, v. 126, n. 3, p. 702-716, 1996.

PAN, T. M. Current status and detection of genetically modified organisms. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 4, p. 229-241, 2002.

PELAEZ, V. Biopoder & regulação da tecnologia: O carácter normativo da análise de risco dos OGMs. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 145-158, 2004.

PESSANHA, L. D. R.; WILKINSON, J. Transgênicos provocam novo quadro regulatório e novas formas de coordenação do sistema agroalimentar. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 2, p. 263-303, 2003.

PETIT, L.; BARAIGE, F.; BALOIS, A. M.; BERTHEAU, Y.; FACH, P. Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay, v. 217, p. 83-89, 2003.

PINTO, G. B. A.; SILVA, M.; GREINER, R.; KONIETZNY, U.; SOCCOL, C. R.; SPIER, M. R.; FILHO, M. A. S. C.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Application of Polymerase Chain Reaction for high sensitivity detection of roundup ready™ soybean seeds and grains in varietal mixtures. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 277-285, 2011.

POMS, R. E.; HOCHSTEINER, W.; LUGER, K.; GLOSSL, J.; FOISSY, H. Model studies on the detectability of genetically modified feeds in milk. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 2, p. 304-310, 2001.

POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science**, v. 64, p. 360-365, 2008.

QUERCY, M.; JERMINI, M.; VAN DEN EEDE, G. Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms – User Manual. European Communities, ISBN: 92-72-02242-3, Italy, 2006. Disponível em: <<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20EN/User%20Manual%20EN%20full.pdf>>. Acesso em: 07/2012.

ROTT, M. E.; LAWRENCE, T. S.; WALL, E. M.; GREE, M. J. Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5223-5232, 2004.

SÁNCHEZ, L.; CREGO, A.; GONZÁLEZ, R.; CIFUENTES, A. Desarrollo de métodos analíticos avanzados para el estudio de organismos modificados genéticamente. Combinación de técnicas de PCR y técnicas electroforéticas capilares. **Cromatografía y Técnicas Afines**, v. 27, n. 1, p. 18-32, 2006.

SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v. 15, p. 88-90, 2000.

SCHOLTENS, I. M. J.; KOK, E. J.; HOUGS, L.; MOLENAAR, B.; THISSEN, J. T. N. M.; VAN DER VOET, H. Increased efficacy for in-house validation of real-time PCR GMO detection methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2213-2227, 2010.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; SANTANA, H.; SINHORITA, D.; da SILVA, R. B.; OLIVEIRA, M. A. R. Fluxo gênico em soja na região oeste do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 515-520, 2007.

SIGMA-ALDRICH. Fluorescent probes for quantitative real-time PCR and other applications. **Bionucleics**. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Brochure/fluorescent_dna_probes.Par.0001.File.tmp/fluorescent_dna_probes.pdf>. Acesso em: 10/2012.

SHAW, D. R.; OWEN, M. D. K.; DIXON, P. M.; WELLER, S. C.; YOUNG, B. G.; WILSON, R. G.; JORDAN, D. L. Benchmark study on glyphosate-resistant cropping systems in the United States. Part 1: Introduction to 2006-2008. **Pest Management Science**, v. 67, p. 741-746, 2011.

SHIMIZU, E.; KATO, H.; NAKAGAWA, Y.; KODAMA, T.; FUTO, S.; MINEGISHI, Y.; WATANABE, T.; AKIYAMA, H.; TESHIMA, R.; FURUI, S.; HINO, A.; KITTA, K. Development of a screening method for genetically modified soybean by plasmid-based quantitative competitive polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5521-5527, 2008.

SOLLÉRO, B. P.; DE FARIA, D. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; PAIXÃO, D. M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. **Zootec**, 2004.

STOBIECKA, M.; CIESLA, J. M.; JANOWSKA, B.; TUDEK, B.; RADECKA, H. Piezoelectric sensor for determination of genetically modified soybean roundup ready® in samples not amplified by PCR. **Sensors**, v. 7, p. 1462-1479, 2007.

STUDER, E.; RHYNER, C.; LUTHY, J.; HUBNER, P. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. **Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung and Forschung**, v. 207, p. 207-213, 1998.

TAKABATAKE, R.; AKIYAMA, H.; SAKATA, K.; ONISHI, M.; KOIWA, T.; FUTO, S.; MINEGUISHI, Y.; TESHIMA, R.; MANO, J.; FURUI, S.; KITTA, K. Development and evaluation of event-specific quantitative PCR method for genetically modified soybean A2704-12. **Food Hygiene and Safety Science**, v. 52, n. 2, p. 100-107, 2010.

TASKI-AJDUKOVIC, K.; NIKOLIC, Z.; VUJAKOVIC, M.; MILOSEVIC, M.; IGNJATOV, M.; PETROVIC, D. Detection of genetically modified organisms in processed meat products on the Serbian food market. **Meat Science**, v. 81, p. 230-232, 2009.

TENGEL, C.; SCHUBLER, P.; SETZKE, E.; BALLE, J.; SPRENGER-HAUBELS, M. PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. **BioTechniques**, v. 31, p. 426-429, 2001.

TIAN, F.; WANG, X.; TENG, D.; YANG, Y.; GUAN, Q.; AO, C.; WANG, J. Optimization of a multiplex PCR assay for detecting transgenic soybean components in feed products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 1225-1234, 2011.

TUNG NGUYEN, C. T. ; SON, R. ; RAHA, A. R. ; LAI, O. M. ; CLEMENTE MICHAEL WONG, V. L. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using molecular techniques in food and feed samples from Malaysia and Vietnam. **International Food Research Journal**, v. 15, n 2, p. 155-166, 2008a.

TUNG NGUYEN, C. T. ; SON, R. ; RAHA, A. R. ; LAI, O. M. ; CLEMENTE MICHAEL WONG, V. L. Comparison of DNA extraction efficiencies using various methods for the detection of genetically modified organisms (GMOs). **International Food Research Journal**, v. 16, p. 21-30, 2009b.

UJHELYI, G.; VADJA, B.; BÉKI, E.; NESZLÉNYI, K.; JAKAB, J.; JÁNOSI, A.; NÉMEDI, E.; GELENCSÉR, É. Surveying the RRS soy content of commercially available food products in Hungary. **Food Control**, v. 19, p. 967-973, 2008.

VAN HOEF, A. M. A.; KOK, E. J.; BOUW, E.; KUIPER, H. A.; KEIJER, J. Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 7, p. 767-774, 1998.

VIJAYAKUMAR, K. R.; MARTIN, A.; GOWDA, L. R.; PRAKASH, V. Detection of genetically modified soya and maize: Impact of heat processing. **Food Chemistry**, v. 117, p. 514-521, 2009.

VILA-AIUB, M. M.; VIDAL, R. A.; BALBI, M. C.; GUNDEL, P. E.; TRUCCO, F.; GHERSA, C. M. Glyphosate-resistant weed of South American cropping systems: an overview. **Pest Management Science**, v. 64, p. 366-371, 2008.

VILJOEN, C. D. Detection of living modified organisms (LMOs) and the need for capacity building. **Asian Biotechnology and Development Review**, v. 7, n. 3, p. 55-69, 2005a.

VILJOEN, C. D.; DAJEE, B. K.; BOTHA, G. M. Detection of GMO in food products in South Africa: Implications of GMO labeling. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 73-82, 2006b.

VISBRASIL: Ação direta de vigilância em saúde no Brasil. Disponível em: <<http://www.visbrasil.org.br/resenhas/OrganismosGeneticamenteModificados.pdf>>. Acesso em: 07/2012.

VOLLENHOFER, S.; BURG, K.; SCHMIDT, J.; KROATH, H. Genetically modified organisms in food – Screening and specific detection by polymerase chain reaction. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 5038-5043, 1999.

WAIBLINGER, H. U.; GROHMANN, L.; MANKERTZ, J.; ENGELBERT, D.; PIETSCH, K. A practical approach to screen for authorised and unauthorised genetically modified plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2065-2072, 2010.

WANG, W.; FANG, T. Development of multiplex and quantitative PCR assay to detect genetically modified roundup ready soybean in foods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 12, n. 2, p. 132-138, 2005.

WANG, X.; TENG, D.; TIAN, F.; GUAN, Q.; WANG, J. Comparison of three DNA extraction methods for feed products and four amplification methods for the 5'-junction fragment of roundup ready soybean. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, p. 4586-4595, 2012.

WATANABE, E.; NUTTI, M. R. Alimentos geneticamente modificados: Avaliação de segurança e melhorias de qualidade em desenvolvimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2002.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

WU, HONGHONG.; ZHANG, Y.; ZHU, C.; XIAO, X.; ZHOU, X.; XU, S.; SHEN, W.; HUANG, M. Presence of CP4-EPSPS component in roundup ready soybean-derived food products. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 1919-1932, 2012.

WURZ, A.; BLUTH, A.; ZELTZ, P.; PFEIFER, C.; WILLMUND, R. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. **Food Control**, v. 10, p. 385-389, 1999.

XAVIER, E. G.; LOPES, D. C. N.; PETERS, M. D. P. Genetically modified organisms. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, p. 15-33, 2009.

YAMAGUCHI, H.; SASAKI, K.; UMETSU, H.; KAMADA, H. Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan. **Food Control**, v. 14, p. 201-206, 2003.

YANG, L.; GUO, J.; PAN, A.; ZHANG, H.; ZHANG, K.; WANG, Z.; ZHANG, D. Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maize using one novel

standard reference molecule. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 15-24, 2007.

YOSHIMURA, T.; KURIBARA, H.; MATSUOKA, T.; KODAMA, T.; IIDA, M.; WATANABE, T.; AKIYAMA, H.; MAITANI, T.; FURUI, S.; HINO, A. Applicability of the quantification of genetically modified organisms to foods processed from maize and soy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 2052-2059, 2005.

ZHOU, X.; LIU, W.; LIAN, J.; ZHANG, W. Q. Monitoring of RoundupTM Ready soybean in Guanngdong province in China. **Food Control**, v. 18, p. 1219-1222, 2007.

