

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**DETECÇÃO POR PCR E QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO
REAL DE SOJA ROUNDUP READY™ EM PROTEÍNA TEXTURIZADA
DE SOJA, EXTRATO DE SOJA E INGREDIENTES ALIMENTARES**

FÁBIO CRISTIANO ANGONESI BROD

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em
Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Ana Carolina Maisonnave Arisi.

FLORIANÓPOLIS

Fevereiro de 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades e bênçãos.

À minha amada esposa Lílían, pelo amor e dedicação singulares, pelas horas e horas ao meu lado, sempre disposta e bem-humorada.

Aos meus pais Marcos e Dulce, embora distantes, sempre presentes, com seu apoio, carinho e incentivo.

Ao meu querido irmão Marcos, grande incentivador e profundo conhecedor do universo Marvel.

À professora Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela oportunidade, orientação, estímulo e amizade.

Às grandes amigas Ângela Fiorentini e Maristela Sawitzki, por acreditarem no meu potencial.

À amiga Caroline Tagliari, pelo auxílio na realização deste trabalho.

À professora Dra. Edna Regina Amante pela colaboração com equipamentos de laboratório.

À Perdigão Agroindustrial S/A unidade de Videira – SC, em especial ao amigo Paulo Rogério Franchin, pela colaboração na realização das análises de quantificação.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Hey Ho! Let's Go!

Ramones

RESUMO

Devido à introdução da soja geneticamente modificada Roundup ReadyTM (RR) no mercado brasileiro, a habilidade para detectar organismos geneticamente modificados (OGMs) tornou-se uma necessidade legal. O Decreto 4.680 de 24 de Abril de 2003 prevê que alimentos que contêm acima de 1 % de OGMs em sua composição devem ser obrigatoriamente rotulados. Uma vez que a legislação estipula um limite para a presença de OGMs em alimentos, a detecção qualitativa não atende à exigência imposta. É necessário, então, a utilização de uma ferramenta que forneça dados quantitativos. Tais dados, referentes à presença e teor de soja geneticamente modificada em alimentos, ainda são escassos, principalmente em relação ao Brasil. O objetivo deste trabalho foi a detecção por PCR e quantificação por PCR em tempo real de soja Roundup Ready em proteína texturizada de soja, extrato de soja e ingredientes utilizados na indústria de carnes. O DNA das 114 amostras foi extraído e purificado por um método CTAB. Todas as amostras foram submetidas à pesquisa do gene da lectina de soja, para a verificação da presença de DNA de soja amplificável. Com exceção de 7 amostras de ingredientes, todas as demais apresentaram sinal positivo para este gene. Para a detecção qualitativa de soja RR, foi utilizada uma nested PCR já estabelecida que resultou em uma sensibilidade de 0,01%, considerada aceitável para detecção de OGMs. De um total de 107 amostras analisadas, 62 apresentaram resultado positivo para soja transgênica. 40 amostras de extrato de soja e proteína texturizada foram analisadas por PCR em tempo real, sendo que apenas duas amostras de PTS estavam em desacordo com a legislação.

Palavras-chave: PCR nested, soja Roundup Ready, OGM, PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

Due to the introduction of the genetically modified (GM) crop Roundup ReadyTM (RR) soybean in the Brazilian market, the ability to detect GM crops has become a legal necessity. The edict 4680 from 24th April 2003 stipulates that foodstuffs containing more than 1% of GMOs in their composition must be labelled. Once legislation stipulates a threshold limit for the presence of GMOs in food products, qualitative detection do not perform the requirements, being necessary the use of a tool providing quantitative data. These data, related to the presence and content of genetically modified soybean in food products, are still rare, mainly in Brazil. The aim of this work was the detection of Roundup Ready soybean in texturized soy protein, powdered soymilk and food ingredients used in the meat industry by PCR and quantification by real time PCR. The DNA from 114 samples was extracted and purified by a CTAB method. The soy specific lectin gene was investigated in all samples to verify the presence of soy amplifiable DNA. With the exception of seven ingredient samples, all the samples showed a positive signal for the lectin gene. For qualitative detection of RR soyben, it was used a well-stablished nested PCR that resulted in a sensitivity of 0.01%. From a total of 107 analysed samples, 62 showed a positive signal for transgenic soybean. Forty samples of powdered soymilk and texturized soy protein were analyzed by real time PCR, and only two samples of TSP were in disagreement with the legislation.

Key-words: nested PCR, Roundup Ready soybean, GMO, Real Time PCR.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
SUMÁRIO	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	11
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 OGMs NA AGRICULTURA.....	13
2.2 SOJA ROUNDUP READY (RRS)	14
2.3 PRODUÇÃO DE SOJA NO BRASIL.....	15
2.4 ALIMENTOS DERIVADOS DA SOJA.....	16
2.4.1 <i>Farinha de Soja</i>	17
2.4.2 <i>Concentrado Protéico ou Proteína Concentrada de Soja (PCS)</i>	18
2.4.3 <i>Isolado Protéico ou Proteína Isolada de Soja (PIS)</i>	19
2.4.4 <i>Proteína Texturizada de Soja (PTS)</i>	21
2.4.5 <i>Leite de Soja</i>	22
2.5 ROTULAGEM DE ALIMENTOS CONTENDO OGM.....	23
2.6 DETECÇÃO DE OGMs EM ALIMENTOS.....	25
2.6.1 <i>Deteção por Métodos Baseados na Presença de Proteínas</i>	26
2.6.2 <i>Deteção por Métodos Baseados na Presença de DNA</i>	28
2.6.2.1 <i>Extração de DNA</i>	31
2.6.2.2 <i>Deteção de OGMs em Alimentos por PCR</i>	32
2.7 QUANTIFICAÇÃO DE OGMs EM ALIMENTOS.....	36
2.7.1 <i>PCR Quantitativa Competitiva</i>	37
2.7.2 <i>PCR em Tempo Real</i>	39
2.7.2.1 <i>SYBR Green</i>	39
2.7.2.2 <i>Sondas TaqMan</i>	40

2.7.3 Materiais de Referência.....	48
3. DETECÇÃO DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA EM FARINHA DE SOJA, FÓRMULA INFANTIL E EXTRATO DE SOJA POR NESTED-PCR.....	49
4. DNA RECOMBINANTE EM ADITIVOS CÁRNEOS – DETECÇÃO ESPECÍFICA DE SOJA ROUNDUP READY™ POR NESTED PCR.....	63
5. QUANTIFICAÇÃO DE SOJA ROUNDUP READY EM ALIMENTOS DERIVADOS DE SOJA POR PCR EM TEMPO REAL NO BRASIL.....	81
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	102
7. ANEXOS.....	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição química dos diferentes tipos de farinha de soja	18
Tabela 2.	Composição química típica de um CPS	19
Tabela 3.	Composição química típica de uma PIS	20
Tabela 4.	Alguns Inibidores da PCR	30
Tabela 5.	Comparação de custos e tempo de processamento de diferentes métodos de extração	32
Tabela 6.	Kits disponíveis para detecção de OGMs (AOAC International)	47
Tabela 7.	Iniciadores utilizados para detecção do gene da lectina de soja e soja RR	57
Tabela 8.	Amostras utilizadas neste estudo	74
Tabela 9.	Seqüências dos Iniciadores	75
Tabela 10.	Detecção específica de soja e soja RR por PCR em ingredientes e aditivos	76
Tabela 11.	Seqüências dos Iniciadores	96
Tabela 12.	Concentração de DNA e razão $DO_{260/280}$	96
Tabela 13.	Resultados das análises qualitativa e quantitativa	96
Tabela 14.	Determinação do conteúdo de soja RR em amostras de Extrato de Soja por PCR em tempo real	103
Tabela 15.	Determinação do conteúdo de soja RR em amostras de PCS por PCR em tempo real	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Construção genética presente na soja <i>Roundup Ready</i>	15
Figura 2.	Representação esquemática de um extrusor utilizado para produção de Proteína Texturizada de Soja	21
Figura 3.	Símbolo que deverá ser apresentado no rótulo de alimentos que contenham OGMs em sua composição	25
Figura 4.	Representação esquemática de ensaio ELISA (teste em placa)	27
Figura 5.	Representação do método, detecção de proteína em tiras de fluxo lateral.	27
Figura 6.	Representação esquemática da amplificação de DNA por PCR	29
Figura 7.	Representação esquemática dos alvos das quatro categorias sugeridas por Holst-Jensen <i>et al.</i> (2003) para análise de OGMs por PCR	34
Figura 8.	Ilustração esquemática da QC-PCR	38
Figura 9.	Ilustração esquemática do princípio da reação do fluoróforo SYBR Green	40
Figura 10.	Ilustração esquemática do princípio da sonda TaqMan	41
Figura 11.	Gráfico típico de RT-PCR com as fases da reação destacadas	43
Figura 12.	Amplificação do gene da lectina da soja em amostras de extrato de soja utilizando os iniciadores LEC1/LEC2	58
Figura 13.	Detecção de soja RR por nested PCR	59
Figura 14.	Detecção de soja RR por nested PCR em amostras de fórmula infantil contendo isolado protéico	60
Figura 15.	Detecção de soja por nested PCR em amostras de extrato de soja	61
Figura 16.	Detecção de soja por nested PCR em amostras de farinha de soja	62
Figura 17.	Representação esquemática dos produtos de amplificação do DNA recombinante da soja Roundup Ready TM com os iniciadores GMO	77
Figura 18.	Amplificação do gene da lectina de soja em aditivos cárneos	78
Figura 19.	Detecção de soja RR por nested PCR em amostras de aditivos cárneos	79

Figura 20.	Detecção de soja RR por PCR nested em amostras de proteínas isoladas de soja utilizadas como ingredientes	80
Figura 21	Elektroforese em Gel de Agarose do DNA genômico	97
Figura 22	Amplificação do gene da lectina da soja em amostras de Proteína Texturizada de Soja e Extrato de Soja	98
Figura 23	Detecção de soja RR em Proteína Texturizada de Soja por nested PCR	99
Figura 24	Determinação do conteúdo de soja RR em amostras de Extrato de Soja por PCR em Tempo Real utilizando o TaqMan GMO 35SSoy Detection Kit TM no termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems)	100
Figura 25	Determinação do conteúdo de soja RR em amostras de PTS por PCR em Tempo Real utilizando o TaqMan GMO 35SSoy Detection Kit TM no termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems)	101
Figura 26	Curva Padrão para determinação do conteúdo de soja RR em amostras de Extrato de Soja e PTS por PCR em tempo real	105
Figura 27	Curvas de Amplificação para duas amostras de PTS	106

1. INTRODUÇÃO

A insulina humana foi um dos primeiros produtos resultantes da manipulação genética a ser comercializada e o tomate *Flavr Savr* (SHEEY *et al*, 1988 e SMITH *et al*, 1988) foi o primeiro organismo geneticamente modificado (OGM) a ser comercializado. Desde então, inúmeros outros organismos geneticamente modificados foram aprovados pelas autoridades americanas (FDA) e de outros países, entre eles inúmeras variedades de canola, algodão, milho, tomate, arroz, soja, girassol, fumo, trigo, mamão e melão. A maioria destes OGMs foram desenvolvidos com o intuito de resolver alguns problemas associados à agricultura comercial, como pestes e manejo de ervas daninhas.

Quando a engenharia genética é aplicada buscando a melhoria de propriedades funcionais, como amido de batatas sem a amilose e tomates sem enzimas pectolíticas, os produtos transgênicos são comercializados separadamente dos não transgênicos. Contudo, quando apenas propriedades agronômicas como resistência a insetos e tolerância a herbicidas, como no caso de soja Roundup Ready (RR), os produtos geneticamente modificados não são separados dos convencionais após a colheita (VAN DUIJN *et al*, 1999).

Os países que introduziram a legislação para rotulagem de OGMs em alimentos propiciaram a seus consumidores o poder de escolha sobre os produtos que consomem. A Legislação Mundial determina que governos, indústrias de alimentos, laboratórios e produtores desenvolvam maneiras para avaliar a quantidade de OGMs em alimentos e ingredientes, assegurando assim, sua conformidade com os níveis de produtos geneticamente modificados.

A legislação brasileira define o limite de 1 % de OGM para rotulagem obrigatória. Na comercialização de alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, com presença acima do limite de um por cento do produto, o consumidor deverá ser informado da natureza transgênica desse produto. Tanto nos produtos embalados como nos vendidos a granel ou in natura, o rótulo da embalagem ou do recipiente em que estão contidos deverá constar, em destaque, no painel principal e em conjunto com o símbolo a ser definido mediante ato do Ministério da Justiça, uma das seguintes expressões, dependendo do caso: "(nome do produto) transgênico", "contém (nome do ingrediente ou ingredientes) transgênico(s)" ou "produto produzido a partir de (nome do produto) transgênico". Além

disso, o consumidor deverá ser informado sobre a espécie doadora do gene no local reservado para a identificação dos ingredientes (BRASIL, 2003).

Métodos analíticos são então necessários para evidenciar a presença ou ausência de OGMs, não apenas em matérias-primas, mas também em alimentos processados. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método mais comumente aplicado para a detecção de OGMs, sendo altamente sensível e específico para a amplificação de DNA. Porém, a PCR convencional possui a desvantagem da falta de informação quantitativa. Como a quantificação é um ponto crucial para a rotulagem, somente a utilização de sistemas qualitativos não é adequada para o controle dos limites de rotulagem, sendo obrigatória a utilização de um método quantitativo.

Em extensa pesquisa em várias bases de dados científicos, foram encontrados apenas dois artigos relatando a presença de OGMs em alimentos produzidos e comercializados no Brasil, sendo que apenas um apresenta dados quantitativos. Estes dados, porém, referem-se aos anos de 2000 e 2001, quando a legislação permitia um limite máximo de 4% de OGM. Assim, a necessidade de um levantamento de dados referentes à presença de OGMs em alimentos e sua conformidade com as normas exigidas torna-se urgente, uma vez que o consumidor brasileiro tem o direito de escolha assegurado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OGMs na Agricultura

A transformação genética de plantas consiste na inserção de uma ou mais seqüências em seu genoma. Geralmente isoladas de mais de uma espécie, essas seqüências especialmente arranjadas, visam garantir a expressão gênica de um ou mais genes de interesse. Do ponto de vista legal, no Brasil, OGM é definido como organismo cujo material genético tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética (NODARI e GUERRA, 2001).

Os primeiros produtos resultantes de manipulação genética apareceram no início dos anos 80 e a primeira liberação de um OGM no ambiente ocorreu em 1986, na Inglaterra (ODA e SOARES, 2001).

Em 1996, a área total cultivada com lavouras transgênicas era de 1,7 milhões de hectares. Em 2005 esse número chegou em 90 milhões de hectares, um aumento quase 53 vezes em menos de uma década. Em relação ao ano de 2004, a área global de plantio de transgênicos era de 81 milhões de hectares, ou seja, um aumento de 11% (JAMES, 2005). O número de países que mais cultivam plantas geneticamente modificadas (nações com áreas de plantio de transgênicos de 50 mil hectares ou mais) aumentou de 10 para 14 no ano de 2004, com a inclusão do Paraguai, do México, da Espanha e das Filipinas. A quantidade de nações que respondem pela maior parte da plantação global de transgênicos cresceu de cinco para oito e inclui os Estados Unidos (59% do total global), Argentina (20%), Canadá (6%), Brasil (6%), China (5%), Paraguai (2%), Índia (1%) e África do Sul (1%). Uruguai, Austrália e Romênia completam a lista (JAMES, 2004). Um marco histórico foi alcançado em 2005, quando 21 países semearam lavouras GM, um aumento significativo comparado aos 17 países de 2004. Notavelmente, dos quatro novos países que cultivaram lavouras GM em 2005, três são países da União Européia (Portugal, França e República Tcheca), e o quarto o Irã (JAMES, 2005).

Durante o período de 1996 a 2005, a proporção da área global de lavouras GM cultivadas por países em desenvolvimento aumentou ano após ano. Mais de um terço (38%, contra 34% em 2004) da área global semeada com biotecnologia em 2005, equivalente a 33,9 milhões de hectares, foi cultivada em países em desenvolvimento onde o crescimento entre 2004 e 2005 foi substancialmente mais alto (6,3 milhões de hectares ou 23% de crescimento) do que nos países industrializados (2,7 milhões de hectares ou 5% de crescimento). Em 2005,

os EUA, seguido pela Argentina, Brasil, Canadá e China continuaram sendo os principais usuários de lavouras GM (JAMES, 2005).

A soja geneticamente modificada (GM) ocupou 54,4 milhões de hectares plantados (60% da área total com lavouras transgênicas), mais do que os 48,4 milhões de hectares do ano anterior (JAMES, 2005).

As culturas transgênicas de alimentos autorizadas para comercialização são inúmeras: na Argentina, a soja em 1996, o milho e o algodão em 1998; no Canadá, o milho e o algodão em 1996, a canola em 1997, a soja e o melão em 1998, a batata e o trigo em 1999; nos EUA, o melão, a soja, o tomate, o algodão e a batata em 1994, a canola e o milho em 1995; no Japão, a soja, a canola, a batata e o milho em 1996, o algodão e o tomate em 1997 (<http://www.agbios.com>).

No Brasil, somente em 1995 adotou-se uma legislação normatizando o uso de técnicas de engenharia genética (BRASIL, lei 8974/95) e a liberação de OGMs no ambiente (BRASIL, decreto 1752/95). O primeiro organismo geneticamente modificado aprovado para comercialização foi a soja Roundup Ready, em 1998. Em 2003, com a MP 131, o plantio da soja RR foi aprovado para a safra 2003/2004. Hoje o plantio desta linhagem é permitido, sendo proibida sua comercialização como semente (BRASIL, 2005).

2.2 Soja Roundup Ready (RRS)

A linhagem GTS-40-3-2 foi desenvolvida pela Monsanto para permitir a utilização do herbicida glifosato como um sistema de controle de ervas daninhas na produção de soja. Esta linhagem foi desenvolvida através da tecnologia do DNA recombinante e contém um novo elemento em seu genoma, o gene CP4-EPSPS da *Agrobacterium tumefaciens* que codifica a enzima 3-enolpiruvil-chiquimato-5-fosfatossintase (EPSPS), responsável pela tolerância ao glifosato (PADGETTE *et al.*, 1995).

O glifosato, ingrediente ativo do Roundup®, é um herbicida não-seletivo utilizado mundialmente para controle de ervas daninhas e age como um inibidor competitivo da EPSPS, uma enzima essencial na rota metabólica de biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. A inibição da EPSPS resulta na supressão do crescimento e conseqüente morte da planta (QUERCI e MAZZARA, 2004).

Para obter o aumento da expressão da EPSPS na soja RR, PADGETE *et al* (1995) utilizaram o DNA recombinante contendo: uma porção do promotor CaMV 35S, o gene codificador do peptídeo de direcionamento ao cloroplasto da EPSPS de Petúnia (CTP), o gene codificador da EPSPS da *Agrobacterium sp.* linhagem CP4 e uma porção da região 3' terminal não codificadora do gene da nopalina sintase (NOS 3'), como demonstrado na **Figura 1**.

A enzima CP4EPSPS, derivada de uma bactéria encontrada no solo é um membro da classe de proteínas EPSPS encontradas universalmente em plantas e microrganismos. Esta enzima é naturalmente menos sensível à inibição pelo glifosato e, plantas que a expressam tornam-se tolerantes ao herbicida Roundup (LUTHY, 1999). A composição centesimal e o teor de isoflavonas da soja RR são equivalentes àqueles da soja convencional (TAYLOR *et al*, 1999).



Figura 1: Construção genética presente na soja *Roundup Ready*. **35S:** Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. **CTP:** peptídeo de trânsito para o cloroplasto. **CP4-EPSPS:** gene da 3-enolpiruvil-chiquimato-5-fosfatossintase. **NOS:** terminador da nopalina sintase. Modificado de Padgett *et al.*, 1995.

2.3 Produção de Soja no Brasil

Segundo dados obtidos do MAPA, a produção de soja é dominada por quatro países, que responderam em 2004 por 89,5% da colheita mundial de 206,41 milhões de toneladas: EUA (41,54%), Brasil, (23,84%), Argentina (15,5%) e China (8,6%) (www.agricultura.gov.br).

Dados apresentados pela Food and Agriculture Organization (FAO) mostram que o Brasil foi, pelo 44º ano consecutivo, o segundo maior produtor de soja em 2004. A área plantada de soja aumentou de 21,37 milhões de hectares na safra 2003/2004 para 23,3 milhões de hectares em 2004/2005, um aumento de 9%. A safra 2004/2005 rendeu 51,09 milhões de toneladas de soja, um aumento de 2,6% em relação à safra 2003/2004, que rendeu 49,79 milhões de toneladas (Companhia Nacional de Abastecimento, Conab, 2005).

Dados publicados em 2004 pela Secretaria de Defesa Agropecuária (DAS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) demonstram que a área plantada com soja transgênica no Brasil chegou a 2,78 milhões de hectares na safra de 2003, o que correspondeu a 13,2% da área total plantada com soja no país. Segundo os termos

assinados pelos produtores, o Rio Grande do Sul registrou a maior área cultivada com soja geneticamente modificada: foram 2,59 milhões de hectares, ou 93% do total plantado com variedades transgênicas no país. Nos demais Estados, a área plantada somou 192,9 mil hectares, ou 7% do total do país.

Os produtores brasileiros colheram 4,1 milhões de toneladas de soja geneticamente modificada na última safra, de acordo com dados consolidados pela Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA. O volume corresponde a 8,2% do total de 50,18 milhões de toneladas de soja produzidas pelo país em 2003.

A produção de soja geneticamente modificada foi obtida com base na produtividade de soja convencional e da área plantada com soja geneticamente modificada, declarada em 85.580 termos de compromisso assinados pelos produtores. Os dados confirmam ainda, que a maior parte dessa produção ficou concentrada nos Estados do Rio Grande do Sul (88,1%), Paraná (1,8%), Minas Gerais (1,7%), Goiás (1,4%), Santa Catarina (1,4%) e Piauí (1,4%).

Segundo JAMES (2005), o Brasil aumentou sua área de soja GM de cinco milhões de hectares em 2004 para 9,4 milhões de hectares em 2005.

2.4 Alimentos derivados da soja

Segundo a Associação Brasileira de Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE), em 2004 foram exportados 19,25 milhões de toneladas de soja em grão, 14,5 milhões de toneladas de farelo de soja e 2,52 milhões de toneladas de óleo de soja, totalizando um total de mais de 10 bilhões de dólares.

Durante o processamento do grão, são gerados subprodutos utilizados pela indústria de alimentos como matéria-prima para aditivos, como a lecitina e a proteína de soja, que é amplamente utilizada na indústria de alimentos seja como coadjuvante tecnológico ou nutricional. Importantes fornecedores de proteína vegetal, os ingredientes a base de soja podem ser encontrados em três categorias básicas: isolado protéico, concentrado protéico e farinha de soja. As propriedades funcionais da proteína de soja proporcionam melhora em algumas características sensoriais dos produtos aos quais é adicionada, principalmente o sabor e a textura. Além disso, pode também ser adicionada para aumentar o valor nutricional de alimentos naturalmente pobres em proteínas.

O ponto inicial para todos os produtos protéicos é a soja em grão, que contém aproximadamente 40% de proteína. Como as proteínas são processadas e refinadas, cada uma possui características diferentes, que são expostas a seguir:

2.4.1 Farinha de Soja

As farinhas são as mais simples das proteínas de soja e sua produção pode ser proveniente como uma consequência natural das indústrias de óleo ou de indústrias de atividade independente, ou seja, que produzem somente este tipo de alimento. De fato, muitas indústrias de óleo instalaram linhas de produção de produtos comestíveis em adição às usuais linhas de produção de óleo e farelo (este, utilizado para alimentação animal). As principais diferenças no processamento de farelo e farinhas comestíveis são a qualidade da matéria-prima, a necessidade da separação da casca do grão e um maior controle sanitário na fábrica e no processo (BERK, 1992).

A farinha de soja é um produto obtido por fina moagem da soja integral descascada ou de flocos desengordurados produzidos a partir de grãos descascados. Para ser classificado como farinha, um mínimo de 97% do produto deve passar por uma peneira de 100 mesh. O *grits* de soja, por sua vez, possui essencialmente a mesma composição da farinha, porém com uma maior granulometria (BERK, 1992).

As farinhas de soja são classificadas de acordo com seu teor de lipídeos:

- Farinha desengordurada: obtida a partir de flocos extraídos com solvente, contém menos de 1% de óleo.
- Farinha integral: produzida a partir de soja descascada, contém em torno de 18 a 20% de óleo.
- Farinha de soja com baixo conteúdo lipídico: produzidas pela adição de óleo à farinha de soja desengordurada. O teor de lipídeos varia entre 4,5% e 9%.
- Farinha de soja com alto conteúdo lipídico: produzidas pela adição de óleo à farinha de soja desengordurada. O teor de lipídeos é de cerca de 15%.

Tabela 1: Composição química dos diferentes tipos de farinha de soja

Material	Proteína (%)	Umidade (%)	Gordura (%)	Fibra (%)	Cinzas (%)
Grão	42,6	11,0	20,0	5,3	5,0
Farinha integral	46,6	5,0	22,1	2,1	5,2
Farinha desengordurada	59	7,0	0,9	2,6	6,4

Fonte: BERK, 1992

A farinha pode ser utilizada principalmente em produtos de panificação, onde quantidades consideráveis são utilizadas, particularmente no pão branco. Misturas substituintes de leite contendo farinha desengordurada de soja e de trigo, caseinatos e outros ingredientes nutricionais ou funcionais são adicionados à formulação desses pães. Farinhas desengorduradas com alta solubilidade protéica servem como matéria-prima para a produção de proteína concentrada, isolada e texturizada. São também utilizadas sozinhas ou em combinação com grãos de soja, como matéria-prima na produção de molho de soja.

2.4.2 Concentrado Protéico ou Proteína Concentrada de Soja (PCS)

A proteína concentrada de soja é produzida a partir de grãos de soja de alta qualidade, limpos e descascados pela remoção do óleo e constituintes aquosolúveis não-protéicos, devendo conter não menos que 70% de proteína em base seca.

A proteína concentrada de soja é um produto relativamente novo. Sua disponibilidade como produto comercial data de 1959. Nos últimos 30 anos, este produto tornou-se um ingrediente bem aceito por muitas indústrias de alimentos. Em muitas aplicações, a PCS simplesmente substitui a farinha de soja. Em outras, porém, possui funções específicas que não podem ser substituídas pela farinha. Historicamente, a necessidade do desenvolvimento de PCSs era cobrir dois aspectos importantes: aumentar a concentração de proteína e melhorar o flavor (BERK, 1992).

O teor protéico máximo da farinha, mesmo após remoção completa da casca e do óleo é de 55% (em base seca). Em determinadas aplicações, como em produtos cárneos, um ingrediente protéico de soja com alta porcentagem de proteína é frequentemente preferido.

A matéria-prima para a produção de PCSs é o farelo desengordurado, produzido a partir de grãos descascados, com alta solubilidade protéica. A concentração protéica é aumentada pela remoção da maioria dos constituintes não-protéicos: carboidratos solúveis (mono, di e

oligossacarídeos), substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular e minerais. Normalmente, o rendimento do processo é de 75%.

Tabela 2: Composição química típica de um CPS:

Proteína (base seca) .	Mínimo de 70%
Umidade	Máximo de 8%
Fibra	Máximo de 4,5%
Cinzas	Máximo de 7%
Tamanho da Partícula	95 % < 150 microns
Lipídios	Máximo de 1%

Fonte: BERK, 1992

Assim como a farinha de soja, a proteína concentrada é utilizada em alimentos devido às suas características nutricionais e propriedades funcionais. Nutricionalmente, as características atrativas das PCSs incluem seu alto teor protéico, ausência de fatores anti-nutricionais e seu conteúdo de fibras. As principais características funcionais destas proteínas são a capacidade de retenção de água e gordura e propriedades emulsificantes.

A aplicação mais importante da PCS encontra-se na indústria de carnes, sendo utilizada em produtos de carne bovina, de ave e peixe para aumentar a retenção de água e gordura. A contribuição nutricional em produtos de baixo custo e com baixas quantidades de carne é também significativa.

2.4.3 Isolado Protéico ou Proteína Isolada de Soja (PIS)

A forma mais concentrada das proteínas de soja disponíveis comercialmente possui mais de 90% de proteína em base seca.

Os princípios básicos da produção destas proteínas são simples. Utilizando a farinha de soja como matéria-prima, a proteína é primeiramente solubilizada em água. Esta solução é, então, separada do resíduo sólido. A seguir, a proteína é precipitada da solução, separada e seca. Na produção de PISs para alimentos, toma-se o cuidado de minimizar a modificação química das proteínas durante o processo (BERK, 1992).

Sendo basicamente proteína pura, a PIS pode ser produzida para ser praticamente livre de odor, flavor, cor e fatores anti-nutricionais. Além disso, o alto teor de proteína proporciona uma alta flexibilidade de formulação quando PISs são adicionadas aos alimentos.

Tabela 3: Composição química típica de uma PIS:

Componente	Teor (%) (base seca)
Proteínas	90
Lipídios	0,5
Cinzas	4,5
Carboidratos Totais	0,3

Fonte: BERK, 1992

O procedimento convencional para produção de PIS é baseado na solubilização da proteína em pH neutro ou levemente alcalino e precipitação por acidificação à região isoelétrica, em torno de 4,5. O produto resultante é chamado “PIS isoelétrica”, tendo baixa solubilidade em água e limitada atividade funcional. Diferentes “proteínatos” podem ser produzidos pela ressuspensão da PIS isoelétrica em água com a neutralização com diferentes bases seguida da atomização (*spray-drying*) da solução resultante. Proteinatos de sódio, potássio, amônia ou cálcio podem ser produzidos, dependendo das bases utilizadas para a neutralização. Os três primeiros são altamente solúveis em água, produzindo soluções com propriedades espumante, emulsificante, viscosidade e geleificação. O proteinato de cálcio possui baixa solubilidade em água e são utilizados quando a formulação necessita um alto nível de incorporação protéica com viscosidade excessiva (BERK, 1992).

Visto que a atomização é o método mais comum para retirada da água na produção de PISs, a forma mais comum destas no comércio é em um pó muito fino.

As PISs podem ser utilizadas em vários segmentos da indústria de alimentos:

- Produtos cárneos: em salsichas emulsificadas (tipo frankfurter ou Bologna), PISs são utilizadas devido às suas propriedades de retenção de água e gordura e como estabilizante da emulsão. A utilização de PIS nestes produtos permite a redução na proporção de carnes caras na formulação sem redução de teor protéico.
- Frutos do mar: a aplicação mais importante neste tipo de alimento é a utilização de PIS em embutidos de peixe e surimi.
- Cereais: algumas vezes é utilizado só ou em combinação com farinhas de soja na formulação de misturas que substituem o leite em produtos de panificação.
- Fórmulas infantis: fórmulas infantis onde o leite em pó é substituído por produtos de soja já estão estabelecidas como produtos comerciais. Nestes produtos, a PIS é o ingrediente preferido devido à sua suavidade. Os principais

nichos de mercado para esses produtos são os bebês alérgicos ao leite bovino ou com intolerância à lactose. Contudo, fórmulas dietéticas baseadas na utilização de proteínas de soja estão tendo uma crescente utilização na alimentação geriátrica e pós-operatória, além de programas para redução de peso (BERK, 1992).

2.4.4 Proteína Texturizada de Soja (PTS)

Aplicado às proteínas de soja, o termo texturização significa o desenvolvimento de uma estrutura física que promoverá, quando ingerido, a sensação de se estar comendo carne. Textura de carne é um conceito complexo compreendendo o aspecto visual (fibras visíveis), mastigabilidade, elasticidade, maciez e suculência. Os principais elementos físicos da carne que criam o complexo da textura são: as fibras musculares e o tecido conectivo.

O principal método para produção de proteínas texturizadas é a extrusão termoplástica de farinha desengordurada de soja, proteínas concentrada ou isolada.

Um extrusor consiste basicamente de uma espécie de parafuso que gira continuamente dentro de um cilindro. Este, por sua vez, pode ser liso ou possuir ranhuras (Figura 2). A configuração em parafuso é tal que o volume livre delimitado por uma volta deste parafuso e a superfície interna do cilindro diminui gradualmente do início até o fim do cilindro.

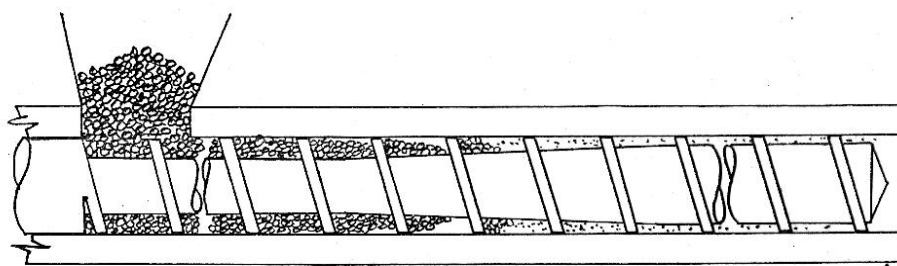


Figura 2: Representação esquemática de um extrusor utilizado para produção de Proteína Texturizada de Soja. BERK, 1992

Como resultado desta configuração, o material é comprimido enquanto é conduzido para frente pelo parafuso. Parafusos possuindo diferentes taxas de compressão são utilizados para diferentes aplicações. O cilindro é freqüentemente equipado com seções de jaquetas aquecidas por vapor e jaquetas resfriadas. Um orifício estreito é fixado na saída do cilindro. A forma deste orifício determina a forma do produto extrusado.

Farinha desengordurada de soja com alta solubilidade protéica é primeiramente condicionada com vapor para aumentar seu conteúdo de água, antes de ser introduzida no extrusor. Um teor de umidade de 20-25% é utilizado para texturização.

A farinha é então inserida no extrusor e capturada pelo parafuso. Enquanto avança pelo cilindro, ela é rapidamente aquecida pela ação da fricção e da energia fornecida pelos elementos de aquecimento (jaquetas) que circundam o cilindro. A alta pressão gerada neste mecanismo permite um aquecimento de 150-180°C. Este processo de rápido cozimento sob pressão transforma a farinha em uma massa fundida, de aspecto plástico. As forças direcionais do sistema permitem o alinhamento de alguns componentes de alto peso molecular, enquanto as proteínas sofrem uma extensiva desnaturação térmica. A repentina liberação da pressão, na saída do cilindro, causa evaporação instantânea de uma determinada quantidade de água e um conseqüente intumescimento da massa. O resultado é uma estrutura porosa que é continuamente cortada por lâminas rotatórias que se encontram logo após o orifício de saída do cilindro. O extrusado pode, então, ser seco e vendido como um produto estável, ou pode ser hidratado, saborizado, misturado a outros ingredientes e vendido, geralmente, como alimento congelado. Mais recentemente, processos para texturização de proteínas concentradas e isoladas foram desenvolvidos. Como nada é removido ou adicionado ao processo de texturização, a composição dos produtos texturizados é essencialmente a mesma que a da matéria-prima (em base seca) (BERK, 1992).

A principal utilização da PTS é como extensor cárneo em produtos como empanados, recheios, linguiças, almôndegas, etc. Em tais produtos uma substituição de 30% da carne por PTS pode ser realizada sem perda de qualidades organolépticas. Além disso, sua capacidade de retenção de água e gordura aumenta a suculência do produto, permitindo a utilização de carnes com alto teor lipídico. PTS em pedaços são comercializadas como análogos de carne, principalmente para o mercado dos vegetarianos e são popularmente conhecidos como “carne de soja” (BERK, 1992).

2.4.5 Leite de Soja

Estritamente falando, o leite de soja é um extrato aquoso dos grãos desta leguminosa, uma emulsão/suspensão das proteínas e carboidratos solúveis em água e a maior parte do óleo. O sabor é, ainda, o principal inconveniente do leite de soja tradicional. Este sabor

desagradável provém de algumas cetonas e aldeídos, produzidos pela oxidação do óleo do grão, mediada pela enzima lipoxidase, que não estão presentes no grão seco, mas são produzidos assim que os grãos forem umedecidos e moídos.

Várias abordagens têm sido utilizadas para superar este problema: inativação térmica da lipoxidase, utilização de matéria-prima desengordurada, desodorização (remoção de odores por evaporação), utilização de adoçantes e saborizantes.

Hoje, a produção de leite de soja e derivados constitui um importante segmento da indústria de alimentos derivados de soja. O processo de produção envolve as etapas de classificação (grãos danificados possuem teor elevado de lipoxidase), descascamento (a casca possui substância indesejadas), inativação enzimática (inativação térmica das enzimas que causam sabor amargo), moagem (em água quente para converter os grãos em uma solução coloidal sem atividade enzimática), decantação (separação das fibras insolúveis para evitar uma sensação arenosa na boca), desodorização (para eliminar compostos voláteis responsáveis pelo flavor tradicionalmente desagradável deste tipo de alimento), padronização (adição de água para obtenção do teor protéico desejado), formulação (adição de adoçantes e saborizantes) e homogeneização (para diminuir o tamanho dos glóbulos de gordura e distribuí-los por toda a solução promovendo um aspecto cremoso ao leite de soja). Após, o leite de soja passa pelo tratamento UHT tradicional (BERK, 1992).

No caso do extrato de soja comercializado no mercado brasileiro, o leite de soja passa por um processo de atomização, onde toda a água é evaporada e o produto resultante é um pó fino, ou seja, leite de soja em pó.

2.5 Rotulagem de Alimentos Contendo OGM

À medida que a discussão sobre a biossegurança dos alimentos geneticamente modificados (AGMs) e sobre as questões de comércio internacional relacionados à biotecnologia se intensifica, observa-se a crescente tendência de distinguir pela rotulagem, AGMs daqueles que não o são (LAJOLO & NUTTI, 2003).

A rotulagem dos alimentos está prevista no Código de Defesa do Consumidor (Lei nº 8.078, de 11/09/90 – art. 6º, III e art. 8º). Trata-se de uma norma para garantir ao cidadão a informação sobre um produto, permitindo-lhe o direito de escolha. Além disso, ela possibilita

a rastreabilidade, pois, em casos de efeitos danosos à saúde humana, os produtos rotulados seriam facilmente identificados e recolhidos (NODARI & GUERRA, 2003).

A segurança alimentar refere-se ao direito do consumidor de saber o que existe nos produtos por ele adquiridos. Sem informação transparente acerca de produtos GMs, a escolha informada não pode ser mantida. Falta de informação também causa impacto negativo para o desenvolvimento da biotecnologia (PAN, 2002).

Devido à comercialização de alimentos e ingredientes alimentares derivados de OGMs, governos de diversos países implementaram regulamentos para a utilização e rotulagem de ingredientes derivados de OGMs e anunciaram teores limites para contaminação não-intencional destes em alimentos: 0,5% na União Européia (Regulamento nº 1829, 2003), 3% na Coreia (CORÉIA, 2000) e 5% no Japão (JAPÃO, 2000). No Brasil, o Decreto nº 4.680 de 24 de abril de 2003, estabelece que tanto os produtos embalados, como os vendidos a granel ou in natura, que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, com presença acima do limite de 1% do produto, deverão ser rotulados, e o consumidor deverá ser informado sobre a espécie doadora do gene no local reservado para a identificação dos ingredientes (BRASIL, 2003). Por exemplo, se um produto puro de soja contém mais de 1% de uma variedade de soja transgênica, este deve ser rotulado. Porém, se contiver apenas 0,5%, não haveria necessidade de rotulá-lo.

Além disso, a lei de biossegurança (lei nº 11.105 de 24/03/2005, BRASIL, 2005), no artigo 40, reafirma 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, conforme regulamento.

A Portaria nº 2658 de 22 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003b) define o símbolo que deve compor a rotulagem tanto dos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal embalados como nos vendidos a granel ou in natura, que contenham ou sejam produzidos a partir de OGMs.

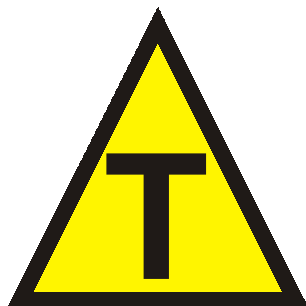


Figura 3: Símbolo que deverá ser apresentado no rótulo de alimentos que contenham OGMs em sua composição.

A rotulagem de alimentos e produtos de plantas geneticamente modificadas parecia, à primeira vista, ser uma opção relativamente simples. Porém, a decisão de introduzir rotulagem envolve considerações técnicas, logísticas e comerciais. Em relação à soja RR, que na forma processada é utilizada em pães, substitutos de leite, aromatizantes, produtos cárneos, margarinas, óleos, produtos de confeitaria e ração animal entre outros, existe uma grande dificuldade para a padronização da rotulagem (SKERRITT, 2000).

Rotular produtos alimentares GMs é uma das principais exigências do Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC) e outras organizações que defendem o direito de escolha do consumidor, a exemplo do que ocorre na maioria dos países da Europa e ao contrário do que se exige nos EUA ou na Argentina que exportam para o Brasil vários tipos de alimentos que possivelmente contêm algum OGM entre seus ingredientes, uma vez que nesses países eles são comercializados livremente no varejo, sem rótulo algum de identificação (LEITE, 2002).

2.6 Detecção de OGMs em Alimentos

Um controle de alimentos é necessário para assegurar a conformidade com a rotulagem e a segurança do alimento, uma vez que as pessoas têm interesse sobre a qualidade e a

segurança dos alimentos que consomem. Na década de 40, o controle de alimentos centrava-se na contaminação microbiológica e fraudes e, em menor extensão à adequação nutricional. Hoje, o controle alimentar cobre todas as áreas da composição química, aspectos higiênicos, adequação nutricional e autenticidade, concentrando-se em compostos químicos presentes apenas em concentrações mínimas ou traços (ANKLAM & BATTAGLIA, 2001). Vários métodos para detecção de OGMs já foram desenvolvidos, a grande maioria baseados na detecção de proteínas e DNA (AHMED, 2002).

2.6.1 Detecção por Métodos Baseados na Presença de Proteínas

Os imunoenaios são métodos utilizados para detecção e quantificação das “novas” proteínas introduzidas através da manipulação genética de plantas. O componente principal de um imunoenensaio é um anticorpo com alta especificidade e afinidade pela molécula alvo, isto é, a proteína recombinante (MARKOULATOS *et al.*, 2004). Vários formatos estão disponíveis para análise de campo (tira de fluxo lateral) e para laboratórios de análise e pesquisa (Western blot e ELISA) (AHMED, 2002).

O método de Western Blot consiste em solubilizar as proteínas da amostra com detergentes e agentes redutores, separá-las em campo elétrico e imobilizá-las em uma membrana, que é imersa em uma solução contendo anticorpos que reconhecem a proteína alvo. Este método, porém, é mais apropriado para laboratórios de pesquisa do que para laboratórios de rotina (AHMED, 2002).

O ensaio ELISA utiliza o mesmo princípio do Western Blot, porém é realizado em placas de poliestireno de 96 poços ao invés de membranas (Figura 4). Os limites de detecção da proteína CP4EPSPS são de 0,25% para o grão e 1,4% para farelo tostado de soja por ELISA (PAN, 2002). A tira de fluxo lateral é uma variante do teste ELISA. O princípio deste método utilizado em testes de campo está representado na figura 5.

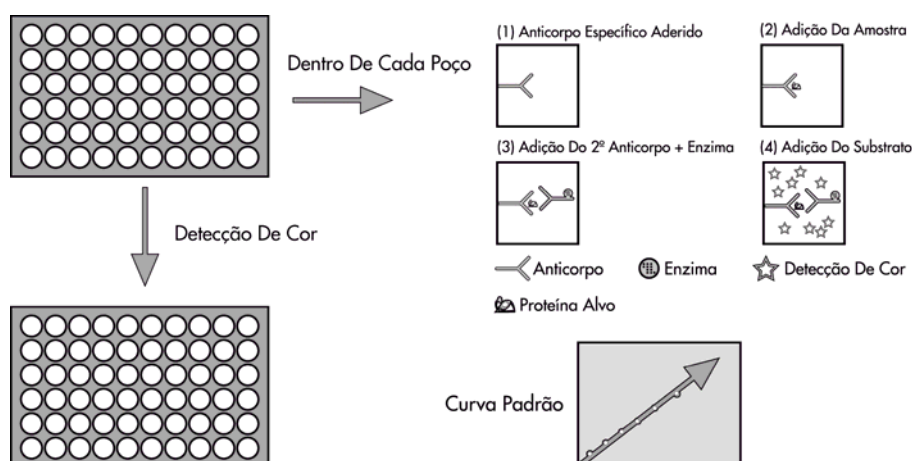


Figura 4: Representação esquemática de ensaio ELISA (teste em placa) (MAGIN *et al.*, 2000).

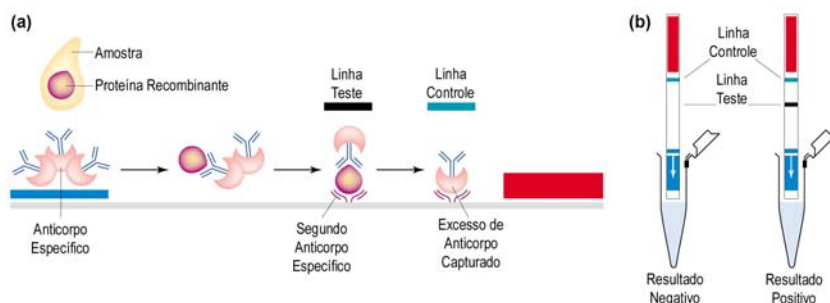


Figura 5: Representação do método, detecção de proteína em tiras de fluxo lateral. (a) Reações que ocorrem na tira. (b) Comparação entre resultados negativo e positivo (AHMED, 2002).

Os métodos imunológicos não são indicados para alimentos processados, uma vez que a natureza química da proteína altera-se com o processamento do alimento, podendo não ser reconhecida pelo anticorpo específico (AHMED, 2002). Outra desvantagem da utilização de sistemas imunológicos na detecção da proteína recombinante é que esta pode não estar sendo expressa na parte da planta utilizada na fabricação de alimentos. Por exemplo, a proteína recombinante do milho Bt176 da Novartis é expressa principalmente nas folhas, ocorrendo uma expressão em níveis muito baixos nos grãos. Além disso, algumas seqüências de DNA introduzidas não são expressas como proteínas, como no caso do tomate *Flavr Savr*, onde apenas RNA é produzido (MARKOULATOS *et al.*, 2004).

2.6.2 Detecção por Métodos Baseados na Presença de DNA

Como o DNA é uma molécula bastante estável, alimentos processados são geralmente analisados através da utilização de métodos baseados na pesquisa desta molécula (GREINER, 2004). Assim, a detecção de DNA recombinante em alimentos é possível através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), um método altamente específico e sensível utilizado para a detecção de pequenas quantidades de DNA.

A tecnologia da PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (moléculas de DNA de fita simples contendo de 10 a 30 bases) utilizados como iniciadores que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação (Figura 6). Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Um ciclo da reação envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão (SOMMA e QUERCI, 2004):

- **Desnaturação:** a dupla fita de DNA se abre tornando-se duas fitas simples. As duas cadeias complementares são separadas através do aumento da temperatura para, em média, 95°C. Assim, as ligações de hidrogênio são quebradas e o número de bases não pareadas aumentam. A etapa termina quando todo o DNA de fita dupla torna-se simples.
- **Anelamento dos Iniciadores:** o anelamento dos iniciadores inicia em baixa temperatura (55 a 65°C). Uma vez reduzida a temperatura, os iniciadores ligam-se à fita simples permitindo o acoplamento da polimerase e o início da cópia do molde.
- **Extensão:** nesta etapa, os iniciadores são estendidos através da sequência alvo utilizando uma DNA polimerase estável ao calor (*Taq* polimerase) na presença de dNPT's, resultando na duplicação do material inicial. A temperatura ideal de trabalho da *Taq* polimerase é de 72°C.

A repetição consecutiva destes três ciclos gera bilhões de cópias da sequência de DNA alvo.

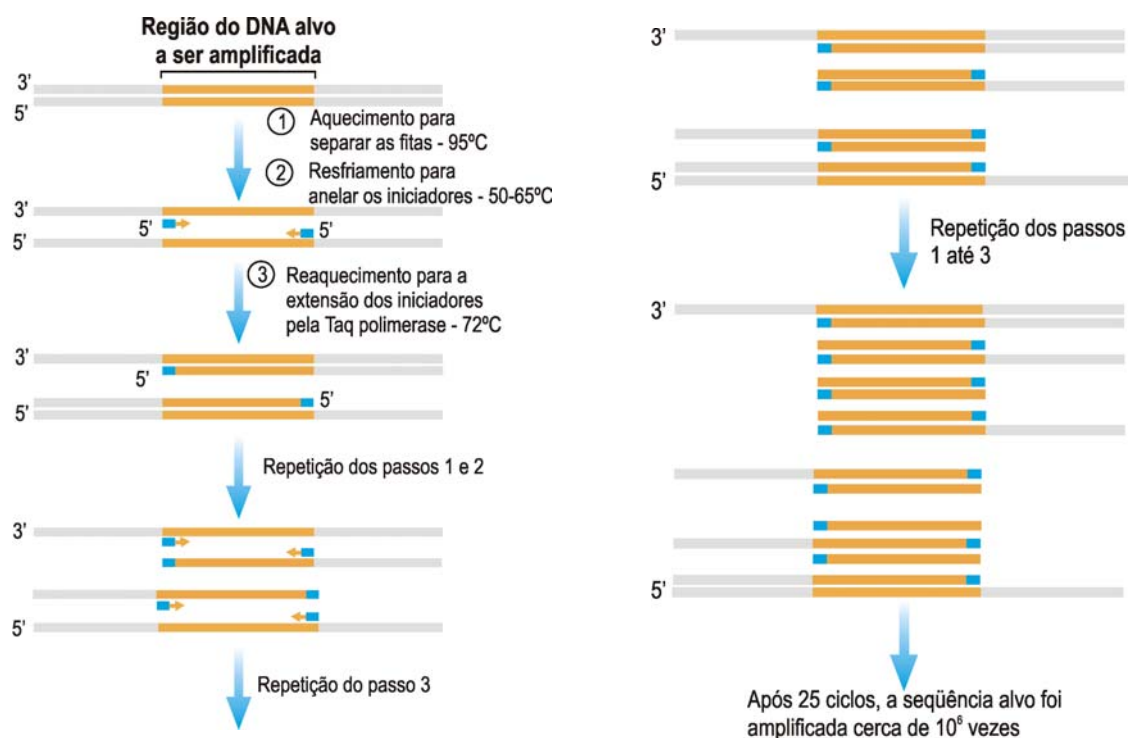


Figura 6: Representação esquemática da amplificação de DNA por PCR (adaptado de LEHNINGER, 2000)

A grande incerteza na utilização de ensaios baseados em DNA, tanto quanto para aqueles baseados em proteínas, porém, é que nem todos os produtos derivados de OGMs contêm DNA suficiente. Além disso, tratamento térmico e outros processos associados à produção de alimentos podem degradar o DNA (AHMED, 2002).

A qualidade e o rendimento do DNA a ser utilizado na PCR são dois fatores críticos na análise de OGMs por esta técnica. A etapa de extração de ácidos nucleicos é o primeiro passo na maioria dos estudos de biologia molecular e em todas as técnicas de DNA recombinante. O objetivo desta importante etapa é a obtenção de um ácido nucleico puro e íntegro, uma vez que a eficiência da PCR depende da qualidade e pureza do DNA extraído (ANKLAM *et al.*, 2002).

Quantidades significativas de DNA amplificável são, geralmente, difíceis de se obter em alimentos processados (KNUT e HOLST-JENSEN, 2001) uma vez que o DNA é

severamente degradado durante o processamento do alimento (GREINER, 2004). Segundo este autor, os alimentos são submetidos a vários níveis de processamento, incluindo tratamentos físicos, químicos e enzimáticos que influenciam na quantidade e qualidade do DNA: processos mecânicos promovem a fragmentação do DNA, tratamentos térmicos resultam na sua degradação e tratamentos enzimáticos acarretam em hidrólise enzimática e modificações no DNA. Segundo PEANO *et al.* (2004), o DNA é muito sensível a agentes ácidos e alcalinos devido ao mecanismo de degradação hidrolítica. Em condições ácidas, as purinas são removidas do esqueleto de ácidos nucleicos devido à clivagem das ligações N-glicosídicas entre os resíduos de desoxirriboses e das bases. Conseqüentemente, as ligações fosfodiester adjacentes são hidrolisadas, acarretando em um encurtamento das fitas do DNA.

A qualidade do DNA varia de acordo com o material em análise, o grau de processamento ao qual a amostra foi submetido e o método de extração aplicado. A pureza do DNA pode ser severamente afetada por vários contaminantes presentes nas matrizes alimentares. Estes contaminantes podem ser substâncias originárias da amostra (polissacarídeos, lipídeos e polifenóis) ou químicos utilizados durante o procedimento de extração do DNA (ANKLAM *et al.*, 2002). Lipídeos, polissacarídeos, polifenóis e outros componentes secundários são conhecidos por causarem problemas na análise de PCR, uma vez que podem interagir irreversivelmente com as proteínas e ácidos nucleicos e agir como inibidores da PCR (GREINER, 2004). Um exemplo clássico é a inibição da *Taq* polimerase por polissacarídeos, SDS, EDTA ou fenol (ANKLAM *et al.*, 2002). Além disso, compostos fenólicos oxidam irreversivelmente o DNA. (SOMMA, 2004). Alguns inibidores que podem prejudicar a eficiência da PCR são listados na Tabela 4. A exclusão destes inibidores torna-se, então, um ponto crucial na análise por PCR.

Tabela 4: Alguns Inibidores da PCR

Inibidores	Concentração Inibitória
SDS	>0,005%
Fenol	>0,2%
Etanol	>1%
Isopropanol	>1%
Acetato de Sódio	>5 mM
Cloreto de Sódio	>25mM
EDTA	>0,5mM
Hemoglobina	>1 mg/ml

Fonte: Somma, 2004.

2.6.2.1 Extração de DNA

Em princípio, dois diferentes protocolos de isolamento de DNA, com inúmeras variações, são utilizados para a extração deste ácido nucléico a partir de matrizes complexas: O método CTAB (cetiltrimetilamônio brometo) e colunas de sílica ligantes de DNA (GREINER, 2004).

Em geral, a extração de DNA deve seguir as etapas abaixo:

1. Lise da parede celular;
2. Rompimento da membrana celular utilizando um detergente (CTAB ou SDS), um componente necessário em qualquer tampão de extração de DNA (assim como o EDTA e um tampão como Tris-HCl);
3. Inativação de nucleases endógenas através da adição de detergentes e EDTA, quelante de cátions bivalentes como Mg^{+2} e Ca^{+2} , co-fatores obrigatórios de muitas enzimas;
4. Proteinase K pode ser adicionada para inativação e degradação das proteínas, particularmente em protocolos que utilizam colunas de sílica ligantes de DNA.
5. A separação de polissacarídeos inibidores é possível devido à sua diferente solubilidade na presença de CTAB em relação ao DNA.
6. A separação de lipídios e polifenóis é realizada através da extração com solventes orgânicos como o clorofórmio;
7. A separação do DNA do detergente é realizada através de precipitação álcool/sal.

Alternativamente aos passos 5 a 7, a separação do DNA dos outros componentes celulares pode ser realizada através da purificação em uma coluna de sílica ligante de DNA (ANKLAM, 2002).

Devido à boa separação dos polissacarídeos do DNA, o método CTAB mostra-se eficiente para uma ampla variedade de vegetais e alimentos derivados. Kits baseados em colunas de sílica ligantes de DNA provaram ser adequados para extração de DNA de boa

qualidade a partir de alimentos processados. Ambos os métodos fazem parte dos Métodos Oficiais para Detecção de OGMs na Suíça (GREINER, 2004).

Um estudo realizado por ZIMMERMANN *et al* (1998) avaliou quantitativa e qualitativamente 9 métodos diferentes de extração de DNA de soja em amostras de alimentos, concluindo que métodos de extração baseados na ligação do DNA em resinas, resultam em um DNA de alta qualidade, porém em pequenas quantidades. Já os métodos mais simples e rápidos, como CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990), resultam em grandes quantidades, mas com qualidade relativamente baixa. De acordo com Greiner e Jany (2002) citados por Greiner (2005), a extração com o método CTAB resulta em um rendimento de DNA maior em comparação ao sistema Wizard baseado em colunas de sílica ligantes de DNA, mas a pureza do DNA isolado é menor. Entretanto, já foi demonstrado que polissacarídeos tendem a se ligar à coluna de sílica, afetando assim a eficiência da separação (ANKLAM *et al.*, 2002).

Segundo OLEXOVÁ *et al.* (2004) e GRYSON *et al.* (2004), no caso da extração e purificação a partir de uma matriz complexa, o método CTAB é mais recomendado que os baseados em resinas ligantes de DNA. Ainda segundo GRYSON *et al.* (2004), o método CTAB apresenta um custo de operação mais baixo que qualquer outro kit comercial, mesmo quando grandes quantidades de amostra são utilizadas. O kit Wizard é o que apresenta o custo mais elevado, cerca de oito vezes mais dispendioso para a mesma quantidade de amostra (1000 mg).

Tabela 5: Comparação de custos e tempo de processamento de diferentes métodos de extração de DNA.

Método de Extração	Tamanho da Amostra (mg)	Custo para 10 amostras (US\$)	Tempo de processamento (h)
Kit Nucleon	1000	1,99	3,0
Kit Wizard	1000	9,87	3,5
Kit Genespin	1000	1,58	4,5
Método CTAB	1000	1,23	7,8

Fonte: GRYSON *et al.*, 2004.

2.6.2.2 Detecção de OGMs em Alimentos por PCR

Segundo MEYER (1999), métodos analíticos baseados na pesquisa do DNA tornaram-se mais importantes na qualidade e segurança de alimentos devido à sua simplicidade,

especificidade e sensibilidade no monitoramento de microrganismos (ALLMANN *et al.*, 1995; CANDRIAN, 1995), detecção de constituintes alimentares como trigo (ALLMANN, CANDRIAN e LÜTHY, 1993) e soja (MEYER *et al.*, 1996) e na identificação de espécies de carnes (MEYER, CANDRIAN e LÜTHY, 1994; MEYER, HÖFELEIN, LÜTHY e CANDRIAN, 1995) e peixes (HÜBNER, BURGENER e LÜTHY, 1997). A detecção do tomate *Flavr Savr* foi o primeiro método desenvolvido especificamente para a identificação de um OGM (MEYER, 1995b,c). Em 1999, alguns métodos qualitativos de detecção de DNA, que forneciam uma resposta presença/ausência, estavam disponíveis para uma ampla gama de alimentos e já haviam sido avaliados em estudos interlaboratoriais (SCHREIBER, 1999).

Nas amostras em que existe DNA GM, todo DNA exógeno introduzido, em princípio, é capaz de ser detectado: seqüências de promotores, genes de interesse introduzidos, sinais de terminação e genes marcadores (CRESPO *et al.*, 2001).

Segundo HOLST-JENSEN *et al.* (2003), testes de detecção de OGMs em alimentos podem ser agrupados em quatro categorias, correspondendo a vários níveis de especificidade (Figura 7):

Categoria 1 – Métodos para triagem: a maioria dos OGMs apresentam vários elementos genéticos como o promotor 35S (P-35S) do vírus mosaico da couve-flor (CaMV), o terminador do CaMV (T-35S) ou o terminador da nopalinasintase da *Agrobacterium tumefaciens* (T-NOS). Os vetores de clonagem mais comumente utilizados são plasmídeo pBR322 e seus derivados (pUC19, por exemplo) que contém genes codificadores de resistência a ampicilina (*bla*) ou neomicina/kanamicina (*nptII*) (HOLST-JENSEN *et al.*, 2003). Assim, métodos baseados nesta categoria, ou seja, pesquisa da presença dos elementos P-35S, T-35S, T-NOS, *bla* ou *nptII* possuem amplas aplicações para triagens de organismos geneticamente modificados. Porém, métodos para triagem não podem ser utilizados para a identificação de um OGM específico, visto que a maioria dos OGMs disponíveis possuem um ou mais destes elementos. Além disso, estes ocorrem naturalmente em algumas plantas e microrganismos do solo (PAN, 2002), sendo que a sua presença não implica necessariamente na presença de DNA derivado de um OGM.

Categoria 2 – Métodos gene-específicos: genes de interesse também podem ocorrer naturalmente, mas são freqüentemente alterados, por exemplo, por truncamento. Métodos baseados na pesquisa do gene de interesse são mais específicos que os métodos de triagem,

pois um sinal positivo obtido com um método de categoria 2 normalmente implica na presença de DNA derivado de OGM e, em muitos casos, é possível identificar o OGM do qual este DNA é derivado.

Categoria 3 – Métodos baseados na construção específica: métodos baseados nesta categoria visam junções entre elementos adjacentes do transgene inserido, por exemplo, a junção entre o promotor e o gene de interesse. Com estes métodos um sinal positivo aparecerá apenas na presença de material GM e será possível identificar a fonte do DNA de forma mais segura do que com a utilização de métodos de categoria 2.

Categoria 4 – Métodos evento-específicos: A assinatura de um evento de transformação é a junção entre o genoma receptor e o DNA inserido no locus de integração. Esta junção é o alvo da categoria 4. No entanto estes métodos apresentam limitações. Quando dois OGMs são cruzados (dois diferentes milhos GM como T25 e Mon 810), o híbrido descendente pode conter modificações genéticas incluindo as assinaturas dos dois eventos e serão indistinguíveis dos organismos genitores em uma análise de PCR. Este fenômeno é conhecido como *gene stacking* ou “empilhamento de genes”. Nos EUA este tipo de OGM híbrido não é regulado se os dois organismos genitores são autorizados. Na Europa o híbrido é tratado como um novo OGM e exige autorização própria.

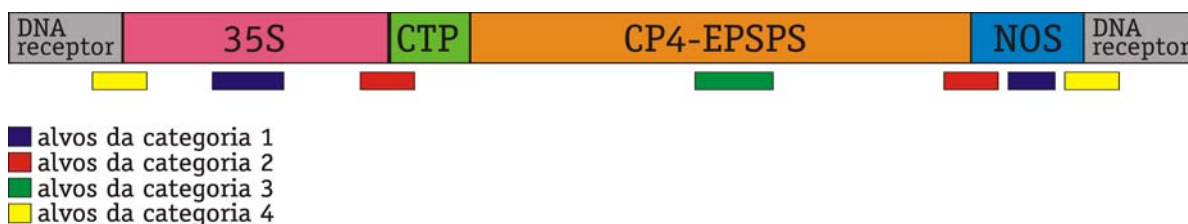


Figura 7: Representação esquemática dos alvos das quatro categorias sugeridas por HOLST-JENSEN *et al.* (2003) para análise de OGMs por PCR. Como exemplo, a construção genética presente na soja *Roundup Ready*. **35S:** Promotor 35S do vírus mosaico da couve-flor. **CTP:** peptídeo de trânsito para o cloroplasto. **CP4-EPSPS:** gene da 3-enolpiruvil-chiquimato-5-fosfatossintase. **NOS:** terminador da nopalina sintase.

O protocolo para análise de OGMs em alimentos segue algumas linhas gerais, apresentadas a seguir:

- Extração e purificação do DNA da amostra através de um método apropriado;
- Determinação da concentração de DNA extraído por espectrofotometria ou fluorimetria;

- c) Realização de uma eletroforese em gel de agarose com o DNA extraído para a verificação de sua qualidade, ou seja, o seu grau de fragmentação;
- d) Determinação da presença de DNA amplificável, pela amplificação de fragmentos de genes específicos presentes na amostra a ser analisada. No caso da soja, amplifica-se um fragmento do gene da lectina. Para milho, pode-se utilizar a amplificação de fragmentos dos genes de uma zeína ou da invertase.
- e) Amplificação do DNA com iniciadores específicos para seqüências presentes no transgene.

A presença de bandas específicas e de tamanho esperado nos perfis de eletroforese da amostra e do controle positivo (padrão de referência certificado) e ausência desta banda no controle negativo (padrão de referência certificado) significa a provável presença de OGM na amostra. Em outras palavras, quando o produto da PCR proveniente da amplificação do DNA recombinante estiver presente no perfil de eletroforese da amostra, o resultado indica a presença de OGM. É necessário, porém, ter cuidado com a possibilidade de resultados falso-positivos. Além disso, a detecção de seqüências de promotores ou terminados não é prova concreta de que o alimento contém DNA GM, como visto anteriormente.

Dessa forma, o resultado positivo deve ser verificado para confirmação que o fragmento de DNA amplificado é realmente o DNA recombinante presente no OGM sob análise. Diferentes métodos podem ser utilizados para confirmar o resultado da PCR: clivagem do produto amplificado por digestão com endonucleases de restrição, sequenciamento do produto da PCR ou a realização de uma PCR nested.

A PCR nested, descrita com sucesso por MEYER e JACCAUD (1997) para detecção da soja Roundup Ready, é realizada em 15 a 30 ciclos com um par de iniciadores e então uma segunda reação com um segundo par de iniciadores, visando uma região interna do produto da primeira amplificação, por mais 15 a 30 ciclos. Neste caso, o fragmento maior produzido pela primeira PCR servirá como molde para a segunda. A utilização deste método aumenta drasticamente a sensibilidade e especificidade da amplificação do DNA. A especificidade é acentuada, pois esta técnica quase sempre elimina quaisquer produtos de PCR não específicos os quais, após a primeira PCR, não serão suficientemente complementares ao segundo par de iniciadores para servir como molde para a próxima amplificação. Assim, a seqüência alvo desejada será preferencialmente amplificada. No entanto, o risco de contaminação é uma

desvantagem desta extrema sensibilidade e um grande cuidado deve ser tomado quando da realização deste tipo de reação (SOMMA e QUERCI, 2004).

Diversos métodos foram descritos para detecção de soja Roundup Ready (RR) por PCR (MEYER e JACCAUD, 1997; STUDER *et al.*, 1998; VAN HOEF *et al.* 1998; VOLLENHOFER *et al.*, 1999; HURST *et al.*, 1999; MATSUOKA *et al.*, 1999; HÜBNER *et al.*, 1999; WURZ *et al.*, 1999; TENGEL *et al.*, 2001; PAN e SHIH, 2003; FORTE *et al.*, 2004; ORABY *et al.*, 2005; WANG e FANG, 2005). Pares de iniciadores foram desenhados para amplificar especificamente fragmentos cobrindo a junção entre os seguintes elementos genéticos: o promotor CaMV 35S, a sequência codificadora do peptídeo de endereçamento ao cloroplasto CTP, o gene codificador da CP4-EPSPS e o terminador NOS 3' (Figura 1).

Porém, a PCR convencional possui a desvantagem da falta de informação quantitativa (ANKLAM *et al.*, 2002). Como a quantificação é um ponto crucial para a rotulagem, sistemas qualitativos não são apropriados para o controle dos limites de rotulagem.

2.7 Quantificação de OGMs em Alimentos

Um dos aspectos mais importantes na análise de OGMs é a quantificação, uma vez que o limite máximo destes organismos em alimentos está fixado em 1% (BRASIL, 2003). Esta quantificação, porém, deve ser relativa a algo. Na legislação européia, é relativa ao ingrediente (farinha, por exemplo) e usualmente interpretada com base no peso do produto geneticamente modificado. Em princípio, poderia ser relativa a uma quantidade específica (volume ou peso) de uma matriz (cerveja ou pão, por exemplo), ou número de unidades (partículas, DNA ou moléculas de proteína) (HOLST-JENSEN *et al.*, 2003). De acordo com LAJOLO e NUTTI (2003), os resultados são expressos geralmente em percentual de material GM em um dado ingrediente (o percentual de soja GM sobre o total de soja utilizada na formulação do alimento). Isso significa que a base para o cálculo do teor de material GM deve ser sempre o material do organismo parental, ou seja, a referência para estimativa do conteúdo de soja GM por PCR deve ser sempre o DNA total de soja. Desse modo, o conteúdo de material GM deve ser avaliado para cada ingrediente presente no alimento.

Métodos semiquantitativos e quantitativo-competitivos foram propostos com sucesso (ZIMMERMANN *et al.* 1998; STUDER *et al.* 1998). Apesar disso, a aplicação da PCR em

Tempo Real (HOLLAND *et al.*, 1991; HIGUCHI *et al.*, 1993; HEID *et al.*, 1996) aumentou significativamente a precisão e a confiança da detecção e quantificação de OGMs em alimentos (Vätilingom *et al.*, 1999; Berdal & Holst-Jensen, 2001; Terry & Harris, 2001; Höhne *et al.*, 2002; Taverniers *et al.*, 2004; Peano *et al.*, 2004; Rott *et al.*, 2004; Yoshimura *et al.*, 2005a,b).

2.7.1 PCR Quantitativa Competitiva

A PCR Quantitativa Competitiva fornece meios para determinação de quantidades relativas de DNA (HÜBNER *et al.*, 1999a), envolvendo a co-amplificação de quantidades desconhecidas de um gene alvo específico e quantidades conhecidas de um controle padrão interno no mesmo tubo de reação e pelo mesmo par de iniciadores (Figura 8). Cada amostra é amplificada com quantidades crescentes do competidor, enquanto o volume/concentração da amostra é mantido constante (ANKLAM, 2002).

Em um estudo com 12 laboratórios europeus, nenhum resultado falso-negativo foi encontrado em 246 determinações para seis amostras contendo soja Roundup Ready (RRS) e nenhum resultado falso-positivo foi reportado para o controle negativo. Diferenças interlaboratoriais foram menores para QC-PCR do que para a PCR qualitativa e foram causadas principalmente por homogeneização insuficiente da amostra. Além disso, a calibração da QC-PCR pode ser controlada através de materiais de referência disponível (AHMED, 2002).

A QC-PCR requer o desenvolvimento de competidores apropriados e é altamente sensível a concentrações iniciais e à diluição do DNA padrão. Envolve pipetagem massiva do DNA amplificado e visualização por eletroforese em gel de agarose. Além disso, está associada a riscos significantes de contaminação cruzada (HOLST-JENSEN, 2003).

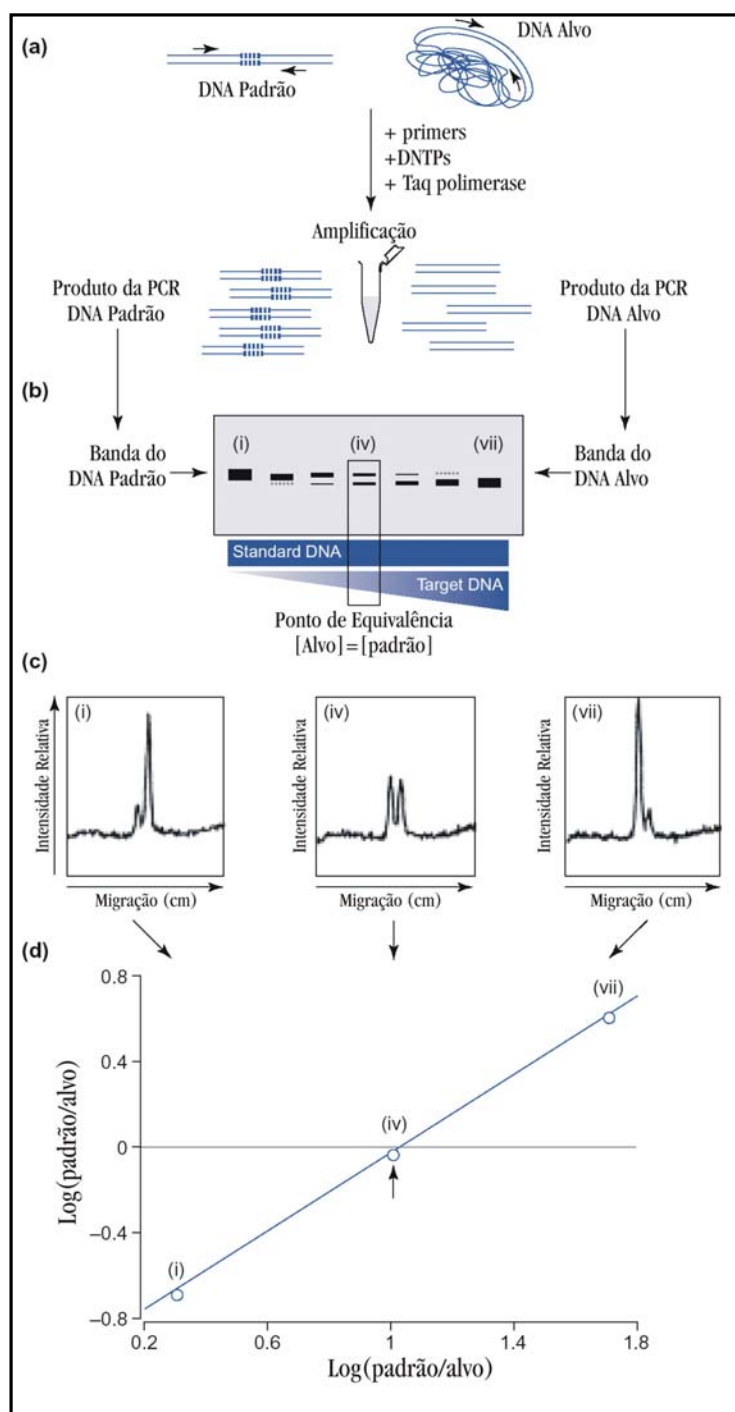


Figura 8: Ilustração esquemática da QC-PCR. DNA padrão e DNA alvo são coamplificados no mesmo tubo de reação (a). Após a PCR, os produtos são separados em gel de eletroforese (b), que distingue o DNA padrão do alvo pelo tamanho do produto. O gel é corado com brometo de etídio. No ponto de equivalência (iv), as concentrações iniciais do DNA padrão interno e do DNA alvo são equivalentes. Análise densitométrica das várias bandas (c) pode ser usado para calcular a regressão linear (d). HÜBNER, 1999.

2.7.2 PCR em Tempo Real

Na PCR em Tempo Real (RT-PCR), a amplificação da sequência alvo de DNA é acompanhada durante toda a reação pelo monitoramento de sinais fluorescentes gerados, medindo a quantidade de moléculas produzidas durante cada ciclo da reação antes do seu término. Esta condição anula a maior desvantagem de sistemas dependentes de gel, que é produzir amplicons em quantidades suficientes para visualização em gel de agarose (MARKOULATOS *et al.*, 2004).

A RT-PCR depende, então, da emissão de um sinal fluorescente induzido por UV e que é proporcional à quantidade de DNA que está sendo sintetizada. Vários sistemas foram desenvolvidos para este fim. Os mais utilizados são descritos a seguir.

2.7.2.1 SYBR Green

O sistema mais simples, barato e direto para RT-PCR envolve a incorporação do fluoróforo SYBR Green, cuja fluorescência sob UV aumenta significativamente quando ligado ao sulco menor da dupla-hélice do DNA (Figura 9). O fluoróforo não ligado produz pouca fluorescência, sendo esta subtraída durante a análise por *software* (LEVIN, 2004). No início da reação, a mistura de reação contém o DNA, os iniciadores e o SYBR Green. Durante a extensão dos iniciadores pela polimerase, as moléculas de fluoróforo ligam-se ao DNA que está sendo sintetizado. A reação é então monitorada continuamente e o aumento da fluorescência, medida ao final de cada etapa de extensão, é observado em tempo real (MARKOULATOS *et al.*, 2004).

Ensaio que faz uso desta técnica apresentam uma sensibilidade de menos de 10 cópias da sequência alvo (MORRISON *et al.* 1998). Uma desvantagem encontrada com a utilização do SYBR Green é a grande dificuldade em verificar a especificidade da amplificação (GARCIA-CAÑAS *et al.*, 2004). Assim, métodos de confirmação tornam-se necessários. Alguns sistemas comerciais incorporaram a capacidade de obter uma curva de desnaturação como um meio de confirmar a identidade do amplicon e fazer a sua diferenciação de dímeros de iniciadores ou amplificações não específicas (LEVIN, 2004).

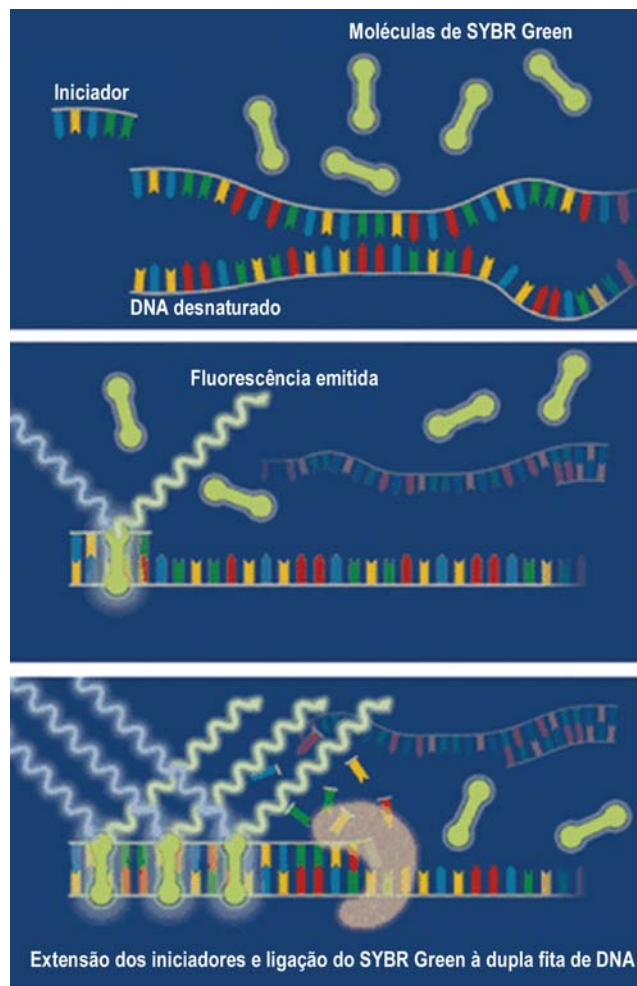


Figura 9: Ilustração esquemática do princípio da reação do fluoróforo SYBR Green.

2.7.2.2 Sondas TaqMan

O sistema TaqMan utiliza-se da atividade exonucleásica 5'– 3' da Taq polimerase para produzir um sinal fluorescente (Figura 10). Esta sonda nada mais é do que um oligonucleotídeo que contém uma sequência de nucleotídeos homóloga à sequência específica de uma das fitas do amplicon, um fluoróforo que emite fluorescência quando excitado (repórter) e um supressor que barra esta emissão quando este estiver próximo ao fluoróforo (GARCIA-CAÑAS, 2004). Uma molécula de fosfato é geralmente anexada ao resíduo 3'-timina para impedir a extensão da sonda anelada durante a amplificação (LEVIN, 2004). Dímeros de iniciadores não são detectados por estas sondas, o que constitui uma vantagem adicional para

sua utilização. O fluoróforo que age como repórter é, geralmente a 6-carboxifluoresceína (FAM) e o supressor a 6-carboxitetrametil-rodamina (TAMRA) (LEVIN, 2004).

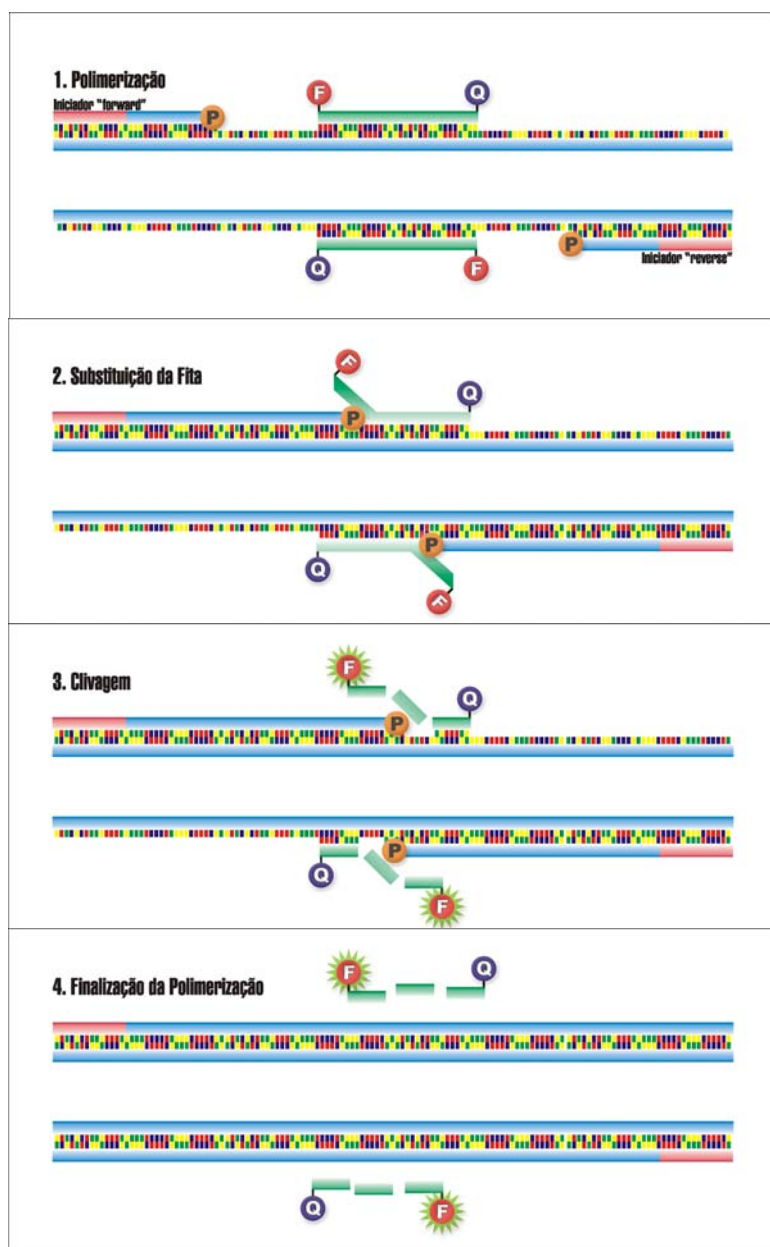


Figura 10: Ilustração esquemática do princípio da sonda TaqMan. **1.** Após o anelamento dos iniciadores e da sonda, é iniciada a polimerização. O repórter (F) ainda tem sua fluorescência absorvida pelo supressor (Q). **2.** A polimerização atinge a sonda e a atividade exonucleásica da polimerase faz com que a sonda comece a ser liberada. **3.** A sonda é clivada pela polimerase e, a uma distância maior do supressor, a fluorescência do repórter não é mais absorvida. **4.** A polimerização da fita de DNA é finalizada e o repórter fluorescente é totalmente liberado no meio. O acúmulo de repórteres fluorescentes é proporcional ao aumento de amplicons.

Quando a sonda está intacta, a transferência de energia fluorescente ocorre e a emissão do corante repórter (FAM) é absorvida pelo supressor (TAMRA). Durante a etapa de extensão, a sonda é clivada pela atividade nucleolítica da polimerase, fazendo com que a emissão fluorescente do repórter não seja mais transferida eficientemente para o supressor, resultando em um aumento no espectro de emissão do repórter (HEID *et al.* 1996). O sinal gerado é proporcional à quantidade de amplicons específicos produzidos durante a PCR.

Para análise de OGMs, dois sistemas são utilizados para obter um resultado quantitativo: um para detectar o transgene específico e outro para detectar uma sequência específica do organismo, conhecida como referência endógena, que pode ser utilizada para quantificação relativa, utilizando-se diferentes repórteres. A análise subsequente gera duas curvas-padrão e permite a determinação da razão inicial dos moldes na reação. Os amplicons de baixo peso molecular geralmente utilizados facilitam cinéticas melhores durante a PCR e são igualmente aplicáveis a alimentos processados, não processados e matrizes alimentares complexas (MARKOULATOS *et al.*, 2004).

A disponibilidade de múltiplos repórteres para sondas TaqMan torna possível a detecção da amplificação de mais de uma sequência alvo por tubo de reação. Um repórter é distinguível de outro (FAM e VIC, por exemplo) porque eles emitem fluorescência em comprimentos de onda distintos (WEIGHARDT, 2004).

A intensidade fluorescente do corante supressor (TAMRA) varia muito pouco durante o curso da PCR. Assim, a intensidade da emissão do TAMRA serve como um padrão interno com o qual pode-se normalizar a variação na emissão do corante repórter. O software calcula um valor denominado ΔR_n utilizando a seguinte equação: $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$, onde R_n^+ = intensidade da emissão do repórter / intensidade da emissão do supressor a qualquer tempo em um tubo de reação, e R_n^- = intensidade da emissão do repórter / intensidade da emissão do supressor medido previamente à amplificação no mesmo tubo de reação. Para a quantificação, é gerada uma média dos valores de ΔR_n s coletados durante a etapa de extensão de cada ciclo. Este valor médio para cada ciclo é então plotado em um “gráfico de amplificação” (Figura 10) (HEID *et al.* 1996).

O valor médio de ΔR_n é plotado no eixo *Y*, e o tempo, representado pelo número de ciclos, é plotado no eixo *X*. Durante os primeiros ciclos da PCR o ΔR_n permanece como uma

linha de base ou ruído. Quando sondas suficientes forem clivadas pela polimerase, a intensidade da emissão do repórter aumentará (HEID *et al.* 1996).

A maioria das amplificações atinge uma fase platô na emissão do repórter se a reação for executada a um alto número de ciclos. O gráfico de amplificação é examinado cedo na reação, em um ponto que representa a fase logarítmica do acúmulo de produtos da reação. Isto é realizado pela determinação de um limite arbitrário que é baseado na variabilidade dos dados da linha de base. Na Figura 11, o limite foi ajustado em 10 desvios padrões acima da média da emissão da linha de base calculada dos ciclos 1 ao 15. Uma vez escolhido o limite, o ponto no qual a curva de amplificação cruza esta linha é chamado Ciclo limite (Ct) (HEID *et al.* 1996).

No decorrer da reação, os dados de fluorescência (ΔRn) vão sendo coletados e um gráfico apresentando a quantidade de sinal *versus* tempo (em nº de ciclos) vai sendo gerado. Na RT-PCR é possível a distinção de três diferentes fases: um primeiro estágio latente com flutuações fracas do sinal correspondendo à linha de base ou ruído; uma segunda fase, exponencial; e uma fase terminal, onde o gráfico atinge um platô.

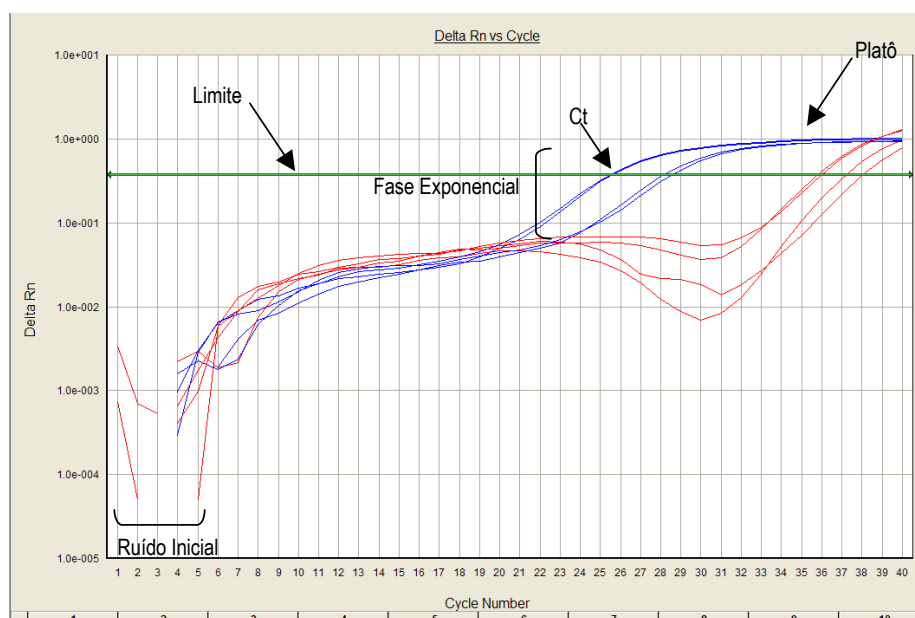


Figura 11: Gráfico típico de RT-PCR com as fases da reação destacadas

A eficiência da RT-PCR reside no fato de que a quantificação não ocorre no final da reação (platô), mas no estágio onde o aumento exponencial na quantidade de DNA

amplificado atinge um ponto significativamente maior que o ruído. Esta forma de medição aumenta significativamente a precisão da quantificação visto que há uma correlação direta entre a quantidade inicial de DNA e o estágio no qual a amplificação torna-se exponencial. Quanto maior a quantidade inicial de DNA, mais cedo o produto amplificado é detectado pelo sistema e mais baixo é o valor de Ct. Na prática, a escolha da linha limite, que determina o valor do Ct, é dependente do operador, representando um dos elementos subjetivos da RT-PCR (WEIGHARDT, 2004).

O conteúdo de OGM de uma amostra pode ser determinado de duas maneiras diferentes:

1. Duas curvas-padrão, baseadas nas quantidades diferentes de DNA, são geradas:

- A primeira curva para a referência endógena
- A segunda curva para a sequência específica

Para cada amostra a quantidade da sequência específica e da referência endógena são determinadas por interpolação com a curva-padrão. O conteúdo de OGM é então calculado como a razão entre a quantidade de sequência específica e a quantidade de referência endógena ($\text{OGM}/\text{referência} \times 100$). É importante considerar que, necessariamente, as amostras em análise devem estar dentro dos limites superior e inferior de ambas as curvas-padrão. Amostras fora da faixa entre os limites devem ser excluídas uma vez que podem ser responsáveis por erros na quantificação.

2. Método comparativo do Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$): este método compara a quantidade relativa da sequência específica com a referência endógena. A curva-padrão é obtida pela leitura de uma série de amostras em diferentes concentrações conhecidas de conteúdo OGM (isto é, materiais de referência certificados – IRMM). O resultado é uma única curva padrão de valores de $\Delta\Delta\text{Ct}$ ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{referência endógena}} - \text{Ct}_{\text{OGM}}$). O conteúdo de OGM é obtido pelo cálculo do valor de ΔCt de uma amostra comparado-o com os valores obtidos com os padrões. Para este método ser bem sucedido, a variação da referência endógena e da sequência específica deveria ser similar. Um método sensível para controlar isto é observar como o ΔCt varia com a diluição do DNA molde. Se as eficiências dos dois amplicons são aproximadamente iguais a curva da análise de regressão (ΔCt versus %OGM em escala logarítmica) deve ser uma reta (inclinação $<0,10$ ou $R^2 > 0,90$).

VAITILINGOM *et al.* (1999) descreveram um método para a quantificação do milho Maximizer e soja RR e demonstraram a quantificação relativa de material GM em diferentes ingredientes alimentares. Estes autores também reportaram como a quantificação do marcador GM e da referência endógena pode ser realizada em um único tubo. Por essa razão, a análise quantitativa não foi afetada por fatores experimentais como erros de pipetagem. Essa PCR multiplex é possível graças à utilização de diferentes repórteres, que podem ser detectados separadamente no mesmo tubo de reação.

A utilização de sistemas de PCR multiplex que usam sondas e iniciadores específicos para vários OGMs vem se tornando mais importante que a PCR padrão (DEISINGH *et al.*, 2005). HERNANDEZ *et al.* (2003) desenvolveram um método de RT-PCR multiplex apropriado para identificação múltipla de OGMs, baseado na utilização do SYBR Green I e análise das curvas de desnaturação dos produtos amplificados. Diferentes produtos de amplificação específicos para milho Maximizer 176, Bt-11, MON810 e GA21 e soja RR foram obtidos e identificados por seus valores de T_m . Esta abordagem multiplex apresentou uma sensibilidade de 0,1% e é uma alternativa à RT-PCR baseada em sondas específicas como TaqMan.

Embora a RT-PCR seja uma técnica eficiente para detecção de OGMs em alimentos, ela possui alguns problemas uma vez que depende decisivamente da correta utilização de materiais de referência para sua calibração (TAVERNIERS *et al.*, 2004). Hoje, a escolha de materiais de referência está sendo debatida, pois a utilização destes pode acarretar em erros na estimativa da concentração do DNA (DEISINGH *et al.*, 2005). Por essa razão, TAVERNIERS *et al.* (2004) descreveram dois novos métodos para a detecção de soja RR por RT-PCR. Nestas abordagens, dois tipos de plasmídeos foram utilizados para calibração. Plasmídeos de alvo único (STPs) ou seja, um plasmídeo com sequência igual à sequência do transgene presente na amostra, diluídos em DNA genômico e plasmídeos de alvos múltiplos (MTPs), ou seja plasmídeos contendo a sequência do transgene e da referência endógena. Foi descrito que ambos os métodos detectaram simultaneamente a sequência do promotor 35S e a referência endógena da soja, isto é, uma sequência do gene da lectina. A quantificação relativa de OGM foi estimada através de dois métodos: (1) um método baseado na comparação direta dos valores de Ct calculados para a sequência específica para OGM e a referência endógena e (2) um método com curva-padrão que calcula as quantidades absolutas de cópias da sequência

específica para OGM. Bons resultados foram obtidos com os dois métodos, sendo que o método (2) com STP como padrões obteve resultados tão bons quanto o método tradicional com padrões de DNA genômico de materiais de referência certificados (TAVERNIERS *et al.*, 2004). Assim, essas abordagens encontrarão ampla utilidade na detecção de OGMs em vários produtos. Porém, a produção de plasmídeos recombinantes exige dispendiosos recursos microbiológicos e de clonagem (DEISINGH *et al.*, 2005) mas uma vez disponíveis são facilmente multiplicados.

Em um interessante estudo, YOSHIMURA *et al.* (2005a,b) investigaram a aplicabilidade da quantificação de milho e soja GM em alimentos por RT-PCR utilizando modelos de alimentos que sofreram tratamento térmico. Sementes moídas de milho MON810 e soja RR foram dissolvidas em água e autoclavadas por vários intervalos de tempo. Os números de cópias calculados para as seqüências recombinantes e de referências endógenas diminuíram com o aumento no tempo de tratamento térmico. Essa diminuição foi influenciada pelo tamanho do produto de PCR amplificado, porém não na mesma razão. Foi reportado que a seqüência recombinante é mais sensível ao tratamento térmico que a seqüência da referência endógena, isto é, a primeira foi mais degradada que a segunda, fazendo com que o resultado final da análise seja subestimado.

Vários kits para a detecção e quantificação de OGMs foram criados, visando aumentar a agilidade da análise de OGMs em alimentos e podem ser encontrados no mercado. Alguns são apresentados na Tabela 6:

Tabela 6: Kits disponíveis para detecção de OGMs (AOAC International)

Companhia	Kit	Matrizes
Applied Biosystems	TaqMan ^R GMO Maize 355 Detection Kit	Alimentos processados e ingredientes, incluindo farinha, farelo, sementes, grãos, tecidos da planta e óleos
Applied Biosystems	TaqMan ^R GMO Soy 355 Detection Kit	Alimentos processados e ingredientes, incluindo farinha, farelo, sementes, grãos, tecidos da planta e óleos
BioteCon Diagnostics GmbH	Bt-176 Maize	Grão
BioteCon Diagnostics GmbH	Round-up Ready Soya	Produtos de soja
EnviroLogix	QualiPlate Kit for Roundup Ready Corn, Event 603 and Cotton	Milho Roundup Ready, Algodão Roundup Ready, Soja e farinha de soja
EnviroLogix	QuickStix Kit for Roundup Ready Bulk Grain	Soja, Milho e Canola Roundup Ready
EnviroLogix	QuickStix Kit for Roundup Ready Leaf & Seed	Soja, Milho e Canola Roundup Ready
Hong Kong DNA Chips Limited	GMO Watcher 1.0 (DNA extraction & quantitative GMO detection kit for unprocessed food)	Ingredientes GM e alimentos não processados
Hong Kong DNA Chips Limited	GMO Watcher 2.0 (DNA extraction & quantitative GMO detection kit for unprocessed food)	Ingredientes GM e alimentos não processados
Investigen, Inc.	CommodityCheck PCR Based GMO Detection Kit	Soja, milho, tomate, canola, não processados, processados e alimentos intermediários
Perkin Elmer	HyPure	Grãos
Promega Corporation	Wizard Magnetic DNA Purification System for Food	Milho, soja, corn, soybeans, cornmeal, corn starch, soy flour, cornflakes, soy milk
Qualicon	BAX for Screening Qualitative GMO	Alimentos
Qualicon	BAX for GMO Quantification	Produtos de Soja
Scil Diagnostics / GeneScan	GMOIdent Kit LibertyLink TM T25 Corn	tecidos vegetais, sementes, farelos, farinhas, grits, alimentos processados e não processados, aditivos alimentares e óleo não refinado
Scil Diagnostics / GeneScan	GMOIdent Kit Maximizer TM Bt176 Corn	tecidos vegetais, sementes, farelos, farinhas, grits, alimentos processados e não processados, aditivos alimentares e óleo não refinado
Scil Diagnostics / GeneScan	GMOIdent Kit Roundup Ready TM Soya	tecidos vegetais, sementes, farelos, farinhas, grits, alimentos processados e não processados, aditivos alimentares e óleo não refinado
Scil Diagnostics / GeneScan	GMOIdent Kit StarLink TM Corn	tecidos vegetais, sementes, farelos, farinhas, grits, alimentos processados e não processados, aditivos alimentares e óleo não refinado
Scil Diagnostics / GeneScan	GMOIdent Kit YieldGard TM Mon810 Corn	tecidos vegetais, sementes, farelos, farinhas, grits, alimentos processados e não processados, aditivos alimentares e óleo não refinado
Scil Diagnostics / GeneScan	GMOScreen Advanced Screening System Basic Kit	tecidos vegetais, sementes, farelos, farinhas, grits, alimentos processados e não processados, aditivos alimentares e óleo não refinado

Strategic Diagnostics	GMO Check Food Ingredient Testing	farinha de soja
Strategic Diagnostics	Trait Check Crop and Grain Testing	farinha de soja e milho
Tepnel BioSystems, Ltd.	BioKits DNA Extraction Kit (GM Foods)	alimentos crus, processados e intermediários
Tepnel BioSystems, Ltd.	BioKits GMO Identification Test Kit	alimentos

Fonte: <http://www.aoac.org/testkits/gmo.html>

2.7.3 Materiais de Referência

Materiais de referência apropriados para controle positivo e negativo fornecem a base para a validação de procedimentos analíticos e para avaliar a performance de métodos e laboratório (AHMED, 2002). Além disso, sua utilização aprimora a precisão de medições analíticas e assegura comparabilidade dos resultados (TRAPMANN *et al*, 2002).

Materiais de referência devem ser independentes dos métodos analíticos e direcionados em materiais não processados ou ingredientes-base e não em alimentos prontos. Cada OGM requer materiais de referência específicos. Grãos, DNA recombinante ou proteínas recombinantes estão sendo utilizados como material de referência (AHMED, 2002). Os materiais de referência certificados mais utilizados atualmente são aqueles produzidos pelo Institute of Reference Materials and Measurements, IRMM, Bélgica (ANKLAM, 2002).

3. DETECÇÃO DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA EM FARINHA DE SOJA, FÓRMULA INFANTIL E EXTRATO DE SOJA POR NESTED-PCR

Artigo aceito em LWT – Food Science and Technology

Fábio Cristiano Angonesi Brod, Cibele dos Santos Ferrari, Luciana Lehmkuhl Valente,
Ana Carolina Maisonnave Arisi*

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346.

88.034-001 Florianópolis-SC BRAZIL

*Autor para correspondência Tel: +55-48-3315382; fax: +55-48-3319943

E-mail: arisi@cca.ufsc.br

Resumo

Devido à introdução da soja geneticamente modificada (GM) Roundup ReadyTM (RR) no mercado brasileiro, a habilidade para detectar OGMs tornou-se uma necessidade legal. Para detectar a presença da soja RR em misturas de soja, farinha de soja, fórmula infantil e extrato de soja comercialmente disponíveis, um método de amplificação por nested PCR foi avaliado e resultou em um amplicon de 169pb, presente em todas as amostras de misturas de soja contendo 0,01% a 10% de soja GM e ausente na soja 0%. Nenhuma das amostras de fórmula infantil apresentaram o sinal positivo após a nested PCR; quatro das seis amostras de farinha de soja e quinze das vinte e cinco amostras de extrato de soja foram positivas para detecção de soja RR. Os resultados mostram que o método de nested PCR utilizado é adequado para avaliar a presença de soja GM nos produtos analisados.

Palavras-chave: soja Roundup ReadyTM ; PCR qualitativa; OGM

3.1. Introdução

Plantas geneticamente modificadas têm sido desenvolvidas para aumentar a tolerância a herbicidas e resolver outros problemas associados à agricultura comercial. A área global de cultivares GM está aumentando. No Brasil, o primeiro e único grão GM cultivado e comercializado é a soja Roundup ReadyTM (Monsanto), tolerante ao herbicida glifosato (Brasil, 2003a, 2005). Produtores brasileiros colheram 4 milhões de toneladas de soja GM, correspondendo a 8% da colheita de soja em 2003/2004.

Devido à introdução da soja geneticamente modificada (GM) Roundup ReadyTM (RR) no mercado brasileiro, a habilidade para detectar OGMs tornou-se uma necessidade legal. A rotulagem de OGMs é regulada pelo Decreto nº 4680 (Brasil, 2003b) que exige a rotulagem de alimentos que contêm OGM acima de 1%: “Artigo 2º Na comercialização de alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, com presença acima do limite de um por cento do produto, o consumidor deverá ser informado da natureza transgênica desse produto.” Este limite de 1% indica que OGMs podem estar presentes em alimentos sem a necessidade de rotulagem se o conteúdo de OGM estiver abaixo de 1%.

O mesmo decreto estipula que o produto poderia ser rotulado como livre de transgênico: “Artigo 4º Aos alimentos e ingredientes alimentares que não contenham nem sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados será facultada a rotulagem “(nome do produto ou ingrediente) livre de transgênicos”, desde que tenham similares transgênicos no mercado brasileiro.” Neste caso, o fornecedor deveria provar a ausência de DNA ou proteína recombinante no produto “livre de transgênico”. Apenas alimentos derivados de soja poderiam ser rotulados como livre de transgênico, uma vez que a soja RR é o único OGM comercializado no Brasil, por exemplo.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um dos métodos mais comumente utilizados para a detecção e identificação de OGMs (Berdal and Holst-Jensen, 2001; Anklam et al, 2002; James et al, 2003; Taverniers et al, 2004). A nested PCR é utilizada para a confirmação do produto da PCR, permitindo a discriminação entre sinais específicos e não-específicos. Assim, o produto da PCR é reamplificado utilizando-se um outro par de iniciadores, que amplificam um fragmento localizado na região interna da sequência alvo original (Anklam et al, 2002). Isto aumenta a sensibilidade da PCR, permitindo que baixos níveis de OGM possam ser detectados (Zimmermann et al, 1998).

Para detectar a presença da soja RR em amostras de farinha de soja, fórmula infantil e extrato de soja comercialmente disponíveis, um método de amplificação por nested PCR foi avaliado.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Amostras

Grãos de soja RR e convencional foram triturados em um liquidificador e peneiradas (50 mesh) sob rigorosas condições para evitar contaminação cruzada. A partir de uma mistura adequada destas amostras (1:10), misturas-padrão contendo 0%, 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1% e 10% p/p de soja RR foram preparadas em nosso laboratório. Após mistura, as amostras foram armazenadas a -20°C. Os produtos de soja (seis amostras de farinha desengordurada de soja, seis amostras de fórmula infantil contendo isolado protéico de soja e vinte e cinco amostras de extrato de soja) foram adquiridas de supermercados e farmácias de Florianópolis, Brasil.

3.2.2. Extração do DNA

O protocolo de extração de DNA foi baseado em Lipp *et al.* (1999). Cem miligramas (100 mg) da amostra foram misturadas a 800 µL de tampão CTAB (CTAB 20 g/L, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, proteinase K 0,5 mg/mL) e incubados a 64°C por 45 min. A seguir, a solução foi incubada com RNase A 0,25 mg/mL a 64°C por 10 min. Após centrifugação a 13000 x g por 10 min, 500 µL de clorofórmio foram adicionados ao sobrenadante em um novo tubo. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, 500 µL de clorofórmio foram adicionados e a lavagem repetida. A fase aquosa foi misturada com 2 volumes de solução CTAB de precipitação (CTAB 5 g/L, 0,04 M NaCl) e incubada por 1h a temperatura ambiente. Após centrifugação a 13000 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e 350 µL de 1,2 M NaCl foi adicionado para dissolver o precipitado. Então, mais 350 µL de clorofórmio foi adicionado. Após nova centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol. Após centrifugação a 13000 x g por 4 min, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente, diluído em 40 µL de TE e armazenado *overnight* a 4°C. As concentrações de DNA foram estimadas com um espectrofotômetro (Hitachi U 2010).

3.2.3. Condições da PCR

Os iniciadores GMO5/GMO9 e GMO7/GMO8 foram desenhados por Meyer e Jaccaud (1997) para detecção de soja RR por nested PCR. Produzem um primeiro fragmento de 447 pb e um segundo fragmento nested de 169 pb. Os iniciadores GMO5 e GMO7 são complementares ao promotor CaMV 35S, GMO9 hibridiza-se à sequência do gene CP4 EPSPS e GMO8 à sequência do CTP. O par de iniciadores LEC1/LEC2 amplifica um fragmento de 164 pb do gene da lectina da soja (Vollenhofer et al., 1999). As seqüências dos iniciadores são listadas na Tabela 7.

As reações de amplificação ocorreram em um volume final de 25 µL contendo tampão de PCR 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 mM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polymerase (Invitrogen) e 2 µL de DNA (máximo de 50 ng). As amplificações foram realizadas em um termociclador MinicyclerTM (MJ Research, Inc. Watertown, MA) com os seguintes programas: Para os iniciadores LEC1/LEC2: desnaturação inicial a 95°C por 12 min seguida de 50 ciclos de 95°C por 1 min, 62°C por 30 s, e 72°C por 30 s; extensão final a 72°C por 10 min. Para os iniciadores GMO5/GMO9: desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 95°C por 30 s, 65°C por 30 s, e 72°C por 40 s; extensão final a 72°C por 3 min. Após amplificação com os iniciadores GMO5/GMO9, 2 µL do produto da PCR foi utilizado como molde na nested PCR com os iniciadores GMO7/GMO8 e as mesmas condições de reação por 35 ciclos.

3.2.4. Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos da PCR (8 µL da reação + 2 µL tampão de carga) foram separados por eletroforese a 400mA e 80V por 50 min em gel de agarose 2,5%, tampão TBE 1X corado com brometo de etídio. A visualização do gel ocorreu em um transiluminador UV e as imagens foram fotografadas com câmera digital (Canon Powershot A70).

3.3. Resultados e discussão

Amostras das misturas de soja RR com conteúdo OGM de 0%, 0.01%, 0.1%, 1% 10% foram preparadas em nosso laboratório a partir de soja 100% convencional (não GM) e soja

100% RR. O DNA foi extraído destas misturas, de seis amostras de farinha de soja, seis amostras de fórmula infantil e vinte e cinco amostras de extrato de soja. Esta extração foi realizada em duplicata, exceto para as amostras de extrato de soja, utilizando um protocolo CTAB (Lipp *et al.*, 1999). A presença de DNA de soja amplificável foi testada com a utilização do par de iniciadores LEC1/LEC2, que amplificam um fragmento do gene da lectina, específico para soja. A amplificação do DNA extraído das amostras com os iniciadores LEC1/LEC2 resultou em forte sinal positivo de 164 pb. Na figura 12, os resultados para DNA isolado de extrato de soja são apresentados como exemplo.

Para detectar a presença de soja RR, o DNA foi amplificado utilizando os iniciadores GMO5/GMO9 e uma nested PCR foi realizada utilizando os iniciadores GMO7/GMO8 para a confirmação da amplificação específica do fragmento RR. Após a nested PCR, um amplicon de 169 pb foi observado para todas as misturas de soja contendo de 0,01% a 10% de soja GM. Este fragmento não foi observado nas misturas de soja de 0% GM e 0,001% GM (Figura 13).

O método de nested PCR foi aplicado para detectar soja RR em farinha desengordurada de soja, fórmula infantil contendo isolado protéico de soja e extrato de soja comercialmente disponíveis em Florianópolis, Brasil. O fato de que todas as amostras de alimentos derivados de soja apresentaram o amplicon esperado de 164 pb, utilizando os iniciadores LEC1/LEC2, demonstra que todas as amostras continham DNA amplificável e que a ausência do amplicon de 169 pb, utilizando os iniciadores GMO7/GMO8, não é devido à presença de substâncias inibidoras da PCR (Zimmermann, 1998).

A soja RR não foi encontrada nas seis amostras de fórmula infantil analisadas (Figura 14), embora o método de extração utilizado neste trabalho tenha sido apropriado para extração de DNA amplificável de soja a partir de fórmula infantil (dados não mostrados). Quinze das vinte e cinco amostras de extrato de soja (Figura 15) e quatro das seis amostras de farinha de soja (Figura 16), apresentaram o sinal positivo de 169 pb para a detecção de soja RR por nested PCR.

Na literatura científica, apenas dois artigos abordam a distribuição de alimentos derivados de soja GM comercializados no Brasil. Greiner *et al.* (2005) analisaram amostras de farinha de soja, alimento infantil e proteína isolada de soja. Nenhuma das sete amostras de alimento infantil continha soja RR, enquanto uma das três amostras de proteína isolada continha soja GM. Em relação às amostras de farinha de soja, treze das trinta amostras

analisadas continham soja RR. Cardarelli *et al.* (2005) analisaram 66 amostras de alimentos contendo soja. Dezesseis amostras apresentaram sinal positivo para detecção de soja RR. Os resultados de Greiner *et al.* (2005), Cardarelli *et al.* (2005) e os apresentados neste trabalho demonstram a presença de alimentos derivados de soja contendo soja GM em supermercados brasileiros.

3.4. Conclusões

Este estudo demonstra que a nested PCR desenvolvida por Meyer & Jaccaud (1997) é adequada para avaliar a presença de soja geneticamente modificada em amostras de farinha de soja, extrato de soja e fórmula infantil contendo proteína isolada de soja devido às exigências legais da rotulagem de alimentos contendo OGM.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq processo 476598/2003-6, Brasil. FCAB, CSF e LLV foram bolsistas da CAPES, Ministério da Educação, Brasil.

Referências

- Anklam, E.; Gadani, F.; Heinze, P.; Pijnenburg, H.; Van Den Eede, G. (2002) Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research Technology*, 214: 3-26.
- Berdal K.G.; Holst-Jensen, A. (2001) 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 Technology*, 213, 432-438
- BRAZIL (2003a) Provisional Measure nº 10.814, December 15th, 2003. Establish the norms for cultivation and commercialization of genetically modified soybean. <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=5553>

- BRAZIL (2003b) Decree nº 4.680, April 24th, 2003. Regulates the information access (Law nº 8.078, September 11th, 1990) concerning foods and ingredients containing or produced from genetically modified organisms. D.O.U. Official Journal of Brazil, Brasília, Brazil. http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/4680_03.htm
- BRAZIL (2005) Law nº 11.105, March 24th, 2005. Regulates items II, IV and V of Paragraph 1 of Article 225 of the Federal Constitution, provides for safety norms and inspection mechanisms for activities that involve genetically modified organisms. http://www.ctnbio.gov.br/index.php?action=/content/view&cod_objeto=1311
- Cardarelli, P.; Branquinho, M.R.; Ferreira, R.T.B.; Cruz, F.P.; Gemal, A.L. (2005) Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. *Food Control*, 16, 859-866
- Greiner, R.; Konietzny, U.; Villavicencio, A.L.C.H. (2005) Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control*, 16, 753-759.
- James, D.; Schmidt, A.M.; Wall, E.; Green, M.; Masri, S. (2003) Reliable detection of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5829-5834.
- Lipp, M.; Brodmann, P.; Pietsch K.; Pauwels, J.; Anklam, E. (1999) IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, 82, 923-928.
- Meyer, R.; Jaccaud, E. (1997) Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. *Proceedings of the EURO FOOD CHEM IX Conference*, Interlaken, Switzerland, Event No. 220 1, 23-28.
- Taverniers, I.; Van Bockstaele, E.; De Loose, M. (2004) Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1198–1207
- Vollenhofer, S.; Burg, K.; Schmidt, J.; Kroath, H. (1999) Genetically modified organisms in food – Screening and specific detection by polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5038-5043.

Zimmermann, A.; Hemmer, W.; Liniger, M.; Lüthy, J.; Pauli, U. (1998) A sensitive detection method for genetically modified MaisGard™ corn using a nested PCR-system. LWT - Food Science and Technology, 31, 664-667

Tabela 7: Iniciadores utilizados para detecção do gene da lectina de soja e soja RR.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Tamanho do Amplicon (bp)	Referência
LEC1	GTGCTACTGACCAAGGCAAACCTCAGCA	164	(Vollenhofer <i>et al.</i> , 1999)
LEC2	GAGGGTTTTGGGGTGCCGTTTTTCGTC AAC		
GMO09	CATGAAGGACCGGTGGGAGAT	447	(Meyer and Jaccaud, 1997)
GMO05	CCACTGACGTAAGGGATGACG		
GMO08	TGGGGTTTATATGGAAATTGGAA	169	(Meyer and Jaccaud, 1997)
GMO07	ATCCCACTATCCTTCGCAAGA		

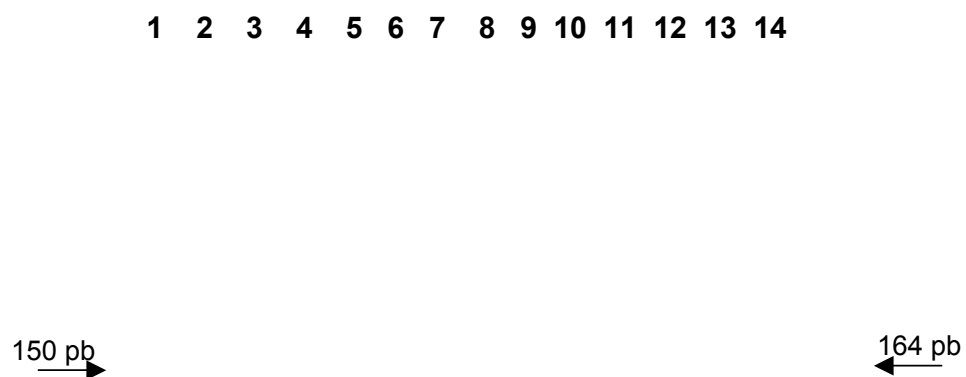


Figura 12. Amplificação do gene da lectina da soja em amostras de extrato de soja utilizando os iniciadores LEC1/LEC2. Canaleta 1: ladder 50 pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle positivo (DNA de soja); canaletas 4-14: amostras de extrato de soja (8 μ L do produto da PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

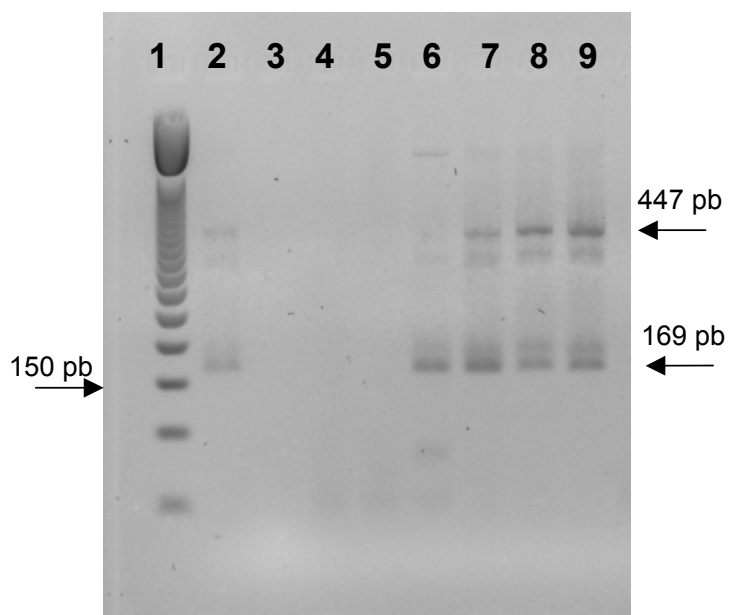


Figura 13. Detecção de soja RR por nested PCR. Canaleta 1: ladder 50 pb (Promega); canaleta 2: controle positivo (soja RR 0,1%); canaleta 3: controle negativo (água); canaleta 4: soja RR 0%; canaleta 5: soja RR 0,001%; canaleta 6: soja RR 0,01%; canaleta 7: soja RR 0,1%; canaleta 8: soja RR 1%; canaleta 9: soja RR 10% (8 μ L do produto da PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

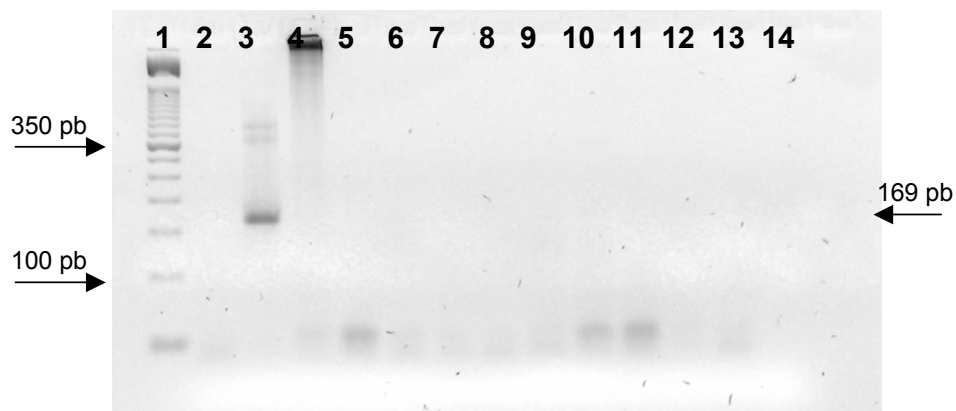


Figura 14. Detecção de soja RR por nested PCR em amostras de fórmula infantil contendo isolado protéico. Canaleta 1: ladder 50 pb (Invitrogen); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle positivo (soja RR 0,1%); canaleta 4: controle negativo (soja RR 0%); canaletas 5-11: amostras de fórmula infantil, primeira extração de DNA; canaletas 12-14: amostras de fórmula infantil, segunda extração de DNA (8 μ L do produto da PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

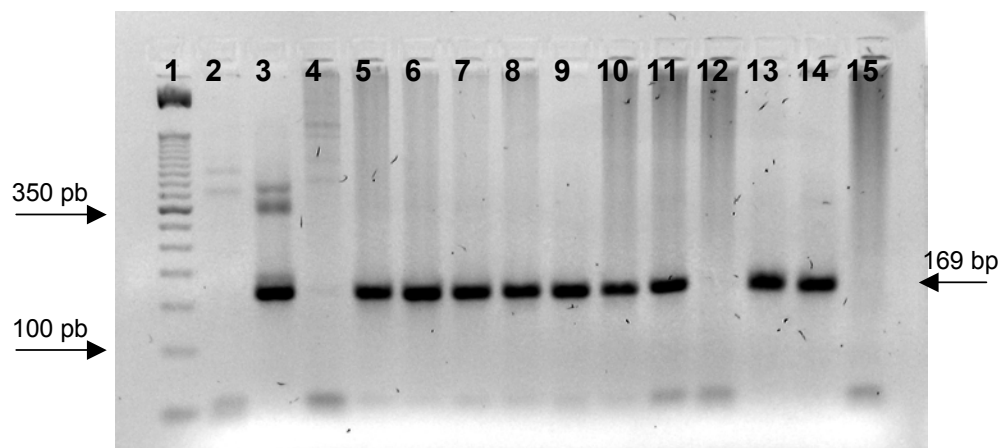


Figura 15. Detecção de soja por nested PCR em amostras de extrato de soja. Canaleta 1: ladder 50 pb (Invitrogen); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle positivo (soja RR 0,1%); canaleta 4: controle negativo (soja RR 0%); canaletas 5-15: amostras de extrato de soja (8 μ L do produto da PCR + 2 μ L tampão de carga por coluna).

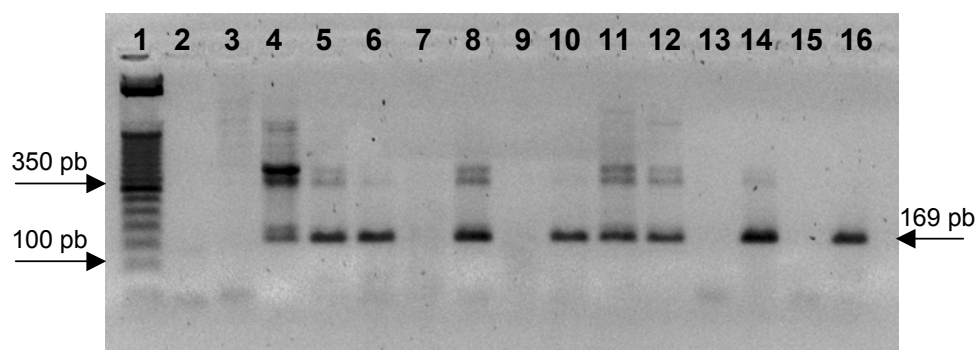


Figura 16. Detecção de soja por nested PCR em amostras de farinha de soja. Canaleta 1: ladder 50 pb (Invitrogen); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle negativo (soja RR 0%); canaleta 4: controle positivo (soja RR 10%); canaletas 5-10: amostras de farinha de soja, primeira extração de DNA; canaletas 11-16: amostras de farinha de soja, segunda extração de DNA (8 μ L do produto da PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

4. DNA RECOMBINANTE EM ADITIVOS CÁRNEOS – DETECÇÃO ESPECÍFICA DE SOJA ROUNDUP READY™ POR NESTED PCR

Artigo submetido a Journal of the Science of Food and Agriculture

Fábio Cristiano Angonesi Brod; Ana Carolina Maisonnave Arisi*

*Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346 - 880034-001 -
Florianópolis, SC - Brazil*

*Autor para correspondência: E-mail: arisi@cca.ufsc.br

Resumo

Proteínas de Soja são amplamente utilizadas pela indústria de carnes como coadjuvante tecnológico na produção de alimentos cárneos processados como produtos emulsificados e produzidos a partir de carne moída. Uma vez que uma legislação para uso e rotulagem de OGMs e ingredientes derivados foi implantada no Brasil, uma nested PCR capaz de detectar soja Roundup Ready™ (RR) foi empregada em aditivos cárneos. Trinta e duas amostras de aditivos cárneos contendo proteína de soja foram testadas para a presença de DNA amplificável de soja e DNA recombinante. Vinte e cinco apresentaram um sinal positivo para o gene da lectina, confirmando a presença de DNA amplificável de soja. Foi observado um sinal positivo para detecção específica de DNA RR em quinze amostras, confirmando a presença de soja geneticamente modificada. Estes resultados demonstram, pela primeira vez, a presença de soja RR em aditivos cárneos. Este método pode ser útil para indústrias de carnes interessadas em controlar a presença de soja RR em aditivos utilizados na fabricação de produtos cárneos.

Palavras-chave: proteína de soja; produtos cárneos; ingredientes; OGM; análise de alimentos; isolamento de DNA

INTRODUÇÃO

Devido à introdução no mercado de OGMs em alimentos e ingredientes, a legislação mundial foi elaborada visando a regulamentação do uso e rotulagem de OGMs e seus derivados. No Brasil, o Decreto 4680¹ estipula um limite de 1% de OGM para rotulagem obrigatória. Além disso, a soja Roundup Ready (RR) é o primeiro organismo geneticamente modificado aprovado para produção e comercialização no Brasil.²

Produtos a base de soja tem sido utilizados com sucesso em alimentos processados. No caso de produtos cárneos, proteínas de soja são amplamente utilizadas em produtos cárneos emulsificados com salsicha de cachorro quente, mortadela, presunto cozido, e produtos a base de carne moída como hambúrgueres, empanados de frango, salame, nuggets, almôndegas, etc³, devido às suas singulares propriedades funcionais como retenção de água e gordura, propriedades de textura e emulsificação e características organolépticas como aparência, firmeza e fatiabilidade.⁴ As proteínas isoladas e concentradas são os principais tipos utilizados na indústria de carnes⁴ e, em alguns casos, estas proteínas são fornecidas na forma de *blends* onde estas são acrescentadas a temperos, corantes, flavorizantes e outros aditivos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um dos métodos mais comumente utilizados na identificação de DNA recombinante e OGMs.⁵⁻⁸ A nested PCR é utilizada para verificar o produto da PCR pela amplificação de um fragmento interno. Esta abordagem em duas etapas melhora a seletividade e sensibilidade da reação⁹, permitindo que baixos níveis de OGM sejam detectados. A utilização da PCR na detecção de OGMs em alimentos processados depende da qualidade e quantidade de DNA isolado.¹⁰ Geralmente, no caso da extração e purificação de DNA a partir de uma matriz complexa, o método CTAB é mais recomendado

que as resinas ligantes de DNA, contudo protocolos de extração de DNA devem ser testados para cada caso.^{10, 11}

O objetivo deste trabalho foi determinar a presença de DNA de soja RR em *blends* e ingredientes protéicos de soja utilizados na indústria de carnes como ingredientes alimentares e em produtos cárneos processados utilizando um protocolo CTAB de extração de DNA e um método de detecção de OGM por nested PCR já estabelecido.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

As 32 amostras de aditivos analisadas neste estudo continham proteína de soja em sua composição e foram cedidas por indústrias que as utilizam na produção de produtos cárneos processados. As oito amostras de produtos cárneos processados foram adquiridas em supermercados de Florianópolis, Brasil. As amostras foram classificadas em três diferentes grupos: Grupo 1, aditivos cárneos que contêm proteína de soja em sua composição, Grupo 2, proteínas de soja utilizadas como ingredientes e Grupo 3, produtos cárneos processados (Tabela 8).

Extração do DNA

Para extração e purificação de DNA de todas as amostras analisadas neste estudo um método CTAB¹² foi seguido com a seguinte modificação: para as amostras do grupo 1, 200 mg de amostra foram utilizados ao invés da quantidade indicada de 100 mg.

Condições da PCR

O par de iniciadores LEC1/LEC2, que amplifica um fragmento de 164 pb do gene da lectina da soja, foi utilizado para detectar DNA amplificável de soja¹³. Os pares de iniciadores GMO5/GMO9 e GMO7/GMO8¹⁴ foram utilizados para a detecção de soja RR por nested PCR, amplificando um primeiro fragmento de 447 pb e um segundo fragmento de 169 pb; os iniciadores GMO5 e GMO7 são complementares ao promotor CaMV 35S, GMO9 hibridiza-se à sequência do gene CP4 *EPSPS* e GMO8 à sequência do CTP (Figura 17). As sequências dos iniciadores são listadas na Tabela 9.

As reações de amplificação ocorreram em um volume final de 25 µL contendo tampão de PCR 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador, 1 unidade de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) e 2 µL of DNA (máximo de 50 ng). As amplificações foram realizadas em um termociclador MinicyclerTM (MJ Research, Inc. Watertown, MA) com os seguintes programas: Para os iniciadores LEC1/LEC2: desnaturação inicial a 95°C por 12 min seguida de 50 ciclos de 95°C por 1 min, 62°C por 30 s, e 72°C por 30 s; extensão final a 72°C por 10 min. Para os iniciadores GMO5/GMO9: desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 95°C por 30 s, 65°C por 30 s, e 72°C por 40 s; extensão final a 72°C por 3 min. Após amplificação com os iniciadores GMO5/GMO9, 2 µL do produto da PCR foi utilizado como molde na nested PCR com os iniciadores GMO7/GMO8 e as mesmas condições de reação por 35 ciclos.

Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos da PCR (10 µL da reação + 2 µL tampão de carga) foram separados por eletroforese a 400mA e 80V por 50 min em gel de agarose 2,5%, tampão TBE 1X e corados com brometo de etídio. A visualização do gel ocorreu em um transiluminador UV e as imagens foram fotografadas com câmera digital (Canon Powershot A70).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas de soja exercem um importante papel como ingredientes indispensáveis na indústria de carnes e são as proteínas vegetais mais utilizadas devido às suas propriedades nutricionais e tecnológicas. Com sua capacidade de retenção de água, as proteínas de soja podem reduzir significativamente o custo final do produto, para benefício da indústria¹⁵. Por esta razão, a utilização de proteínas de soja tem aumentado consideravelmente na indústria de carnes.⁴

Trinta e duas amostras de aditivos cárneos e oito amostras de produtos cárneos processados contendo proteína de soja foram testados para a presença de DNA de soja RR. A presença de DNA de soja e sua amplificabilidade foi confirmada pela utilização de iniciadores específicos para o gene da lectina da soja (le1) através da visualização de um amplicon de 164 pb (Figura 18). Os iniciadores LEC1/LEC2¹³ foram utilizados como um controle específico de DNA de soja para demonstrar que o DNA isolado apresentava qualidade e quantidade suficiente para tornar a análise por PCR possível. As bandas extras abaixo das esperadas de 164 pb provavelmente representam os produtos da formação de dímeros dos iniciadores (Figure 18).

O resultado das quarenta amostras sob investigação está compilado na Tabela 10. O método de extração de DNA utilizado neste trabalho foi apropriado para a extração de DNA de soja amplificável para a maioria das 40 amostras contendo soja (82,5%).

Com relação ao Grupo 1, ou seja, os *blends*, temperos, flavorizantes e melhoradores de sabor, a detecção do gene da lectina não foi possível em alguns casos específicos: os três Melhoradores de Sabor, os três Temperos para Patê e um dos seis *Blends*. Isto deve-se, provavelmente, à degradação do DNA durante tratamentos térmicos^{6,16}, DNA alvo insuficiente ou contaminação do DNA por inibidores de PCR.¹⁷ Para estas amostras o conteúdo de proteína de soja é desconhecido uma vez que esta informação não é revelada por seus produtores devido ao segredo industrial.

Em relação ao Grupo 2, ou seja, as proteínas de soja utilizadas como ingredientes, todas as amostras apresentaram sinal positivo para a detecção do gene da lectina. Neste tipo de amostra uma insuficiência do DNA alvo não ocorre porque a proteína de soja não é misturada a outras substâncias que poderiam diluir o DNA de soja. Os inibidores de PCR não estão presentes já que a composição da amostra não é tão diversa como no caso do Grupo 1.

No caso das amostras do Grupo 3, isto é, os produtos cárneos processados, as oito amostras apresentaram o amplicon de 164 pb, confirmando a presença do gene da lectina e por consequência a presença de DNA de soja. Neste tipo de amostra, o conteúdo de proteína de soja é desconhecido, pois os produtores não revelam esta informação. Porém, ela pode ser obtida da legislação. Um máximo de 0,4 g kg⁻¹ de proteína de soja é autorizado para mortadela¹⁸, salsicha de cachorro quente¹⁸, hambúrguer¹⁹ e empanados de frango. Para presunto cozido¹⁹ o máximo de proteína de soja autorizado é de 0,2 g kg⁻¹.

A detecção de soja geneticamente modificada (GM) foi baseada nas seqüências únicas presentes apenas no DNA de soja Roundup Ready (RR) e ausentes no DNA de soja convencional. As trinta e três amostras com sinal positivo para o gene da lectina foram analisadas para detecção específica de soja RR com os iniciadores GMO5/GMO9. Para confirmar a amplificação do fragmento RR, uma nested PCR foi realizada com os iniciadores GMO7/GMO8. Quinze amostras apresentaram o sinal positivo para detecção de soja RR, um amplicon de 169 pb, confirmando a presença de soja geneticamente modificada nestas amostras. (Figuras 19 e 20). Para esta combinação de iniciadores, a detecção específica de DNA de soja RR apresentou sensibilidade de 0,1% (Figuras 19 e 20). Considerando o Grupo 1, apenas três das dezoito amostras apresentaram DNA de soja RR em sua composição. No Grupo 2, doze das quatorze proteínas de soja apresentaram sinal positivo para soja RR. No Grupo 3, três das oito amostras continham DNA de soja RR (Tabela 10).

Na literatura científica, há poucos artigos que abordam a distribuição de alimentos derivados de soja GM vendidos comercialmente e nenhum sobre a presença desta em ingredientes utilizados na indústria de carnes, como os analisados neste trabalho. Em um estudo recentemente publicado²⁰, 100 amostras de alimentos contendo soja foram analisadas. A soja RR foi encontrada em 21% das amostras. Uma de três amostras de proteína isolada de soja e sete de quinze amostras de farinha de soja continham soja GM. Outro recente trabalho²¹ reportou a análise de sessenta e seis amostras de alimentos contendo soja. Dezesseis amostras apresentaram sinal positivo para detecção específica de soja Roundup Ready. Em um experimento de triagem de OGM em vinte e quatro amostras²², apenas três apresentaram sinal positivo para a presença do promotor CaMV 35S.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo confirmam que o protocolo CTAB clássico pode ser utilizado para extração e purificação de DNA a partir de produtos cárneos processados, proteínas de soja utilizadas como ingredientes e aditivos cárneos como uma primeira etapa na análise OGMs. O par de iniciadores LEC1/LEC2¹³ é apropriado para a detecção do gene da lectina para a maioria das amostras aqui analisadas. Além disso, a nested PCR utilizada neste trabalho é igualmente apropriada para detecção de soja RR neste tipo de amostras.

Nossos resultados demonstram a presença de soja RR em *blends* e proteínas de soja utilizadas na indústria de carnes como ingredientes alimentares e em produtos cárneos processados comercialmente disponíveis em Florianópolis, Brasil.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq processo 476598/2003-6, Brasil. FCAB foi bolsista da CAPES, Ministério da Educação, Brasil.

REFERÊNCIAS

- 1 BRAZIL Decree nº 4.680, April 24th, 2003. Regulates the information access (Law nº 8.078, September 11th, 1990) concerning foods and ingredients containing or produced from genetically modified organisms. D.O.U. Official Journal of Brazil, Brasília, Brazil (2003).

- 2 BRAZIL Law n° 11.105, March 24th, 2005. Regulates items II, IV and V of Paragraph 1 of Article 225 of the Federal Constitution, provides for safety norms and inspection mechanisms for activities that involve genetically modified organisms (2005).
- 3 Endres J, Soy Proteins Products – Characteristics, Nutritional Aspects and Utilization. AOCS Press pp.36-40 (2001).
- 4 Belloque J, García MC, Torre M, Marina ML, Analysis of Soybean Proteins in meat products: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **42** (5): 507-532 (2002).
- 5 Berdal KG, 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. *Eur Food Res Technol* **213**: 432-438 (2001).
- 6 Anklam E, Gadani 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. *Eur Food Res Technol* **214**:3-26 (2002).
- 7 James D, Schmidt AM, Wall E, Green M, Masri S, Reliable detection of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *J Agric Food Chem* 51:5829-5834 (2003).
- 8 Taverniers I, Van Bockstaele E, De Loose M, Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. *Anal Bioanal Chem* 378:1198–1207 (2004).
- 9 Zimmermann A, Hemmer W, Liniger M, Lüthy, J, Pauli U, A sensitive detection method for genetically modified MaisGardTM corn using a nested PCR-system. *LWT -Food Sci Technol* 31:664-667 (1998).

- 10 Gryson N, Messens K, Dewettinck K, Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *J Sci Food Agric* 84:1357:1363 (2004).
- 11 Olexová L, Dovicovicová L, Kuchta T, Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. *Eur Food Res Technol* 218:390-393 (2004).
- 12 Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, Pauwels J, Anklam E. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *J AOAC Int* 82:923-928 (1999).
- 13 Vollenhofer S, Burg K, Schmidt J, Kroath H, Genetically modified organisms in food – Screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* 47(12):5038-5043 (1999).
- 14 Meyer RR, Jaccaud E, Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans. Proceedings of the EURO FOOD CHEM IX Conference, Interlaken, Switzerland, Event No. 220 1:23-28 (1997).
- 15 Macedo-Silva A, Shimokomaki M, VAZ AJ; Yamamoto YY, Tenuta-Filho A, Textured Soy Protein Quantification in Commercial Hamburger. *J Food Compos Anal* 14:469-478 (2001).
- 16 Bauer T, Weller P, Hammes WP, Hertel C, The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *Eur Food Res Technol* 217:338-343 (2003).

- 17 Holden MJ, Blasic JR, Bussjaeger L, Kao C, Shokere LA, Kendall DC, et al. Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. *J Agric Food Chem*, 51:2468–2474 (2003).
- 18 Brazil, Normative Instruction 4, March 31th, 2000. To approve the Technical Regulations of Identity and Quality of Meat Mechanically Separate, of Mortadella, of Sausage and of Hot-dog Sausage. D.O.U. Official Journal of Brazil, Brasília, Brazil (2000).
- 19 Brazil, Normative Instruction 20, July 31th, 2000. To approve the Technical Regulations of Identity and Quality of Meatball, of Cured Cold Meat, of Hamburger, of Kibe, of Cooked Ham and of Ham. D.O.U. Official Journal of Brazil, Brasília, Brazil (2000).
- 20 Greiner R, Konietzny U, Villavicencio ALCH, Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control* 16:753-759 (2005).
- 21 Cardarelli P, Branquinho MR, Ferreira RTB, Cruz FP, Gemal AL, Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. *Food Control* 16:859-866 (2005).
- 22 Oraby HAS, Hassan AA, Mossallam AAA, Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3' terminator. *J Sci Food Agric* 85:1974-1980 (2005).

Tabela 8: Amostras utilizadas neste estudo

Grupo	Amostra	Codigo
1	Blend 1	B1
	Blend 2	B2
	Blend 3	B3
	Blend 4	B4
	Blend 5	B5
	Blend 6	B13
	Tempero Linguiça Toscana 1	B6
	Tempero Linguiça Toscana 2	B12
	Tempero Calabresa	B11
	Tempero Patê 1	B7
	Tempero Patê 2	B9
	Tempero Patê 3	B15
	Tempero 1	B8
	Tempero 2	B17
	Saborizante Presunto	B10
	Melhorador de Sabor 1	B14
	Melhorador de Sabor 2	B16
	Melhorador de Sabor 3	B18
2	Proteína Texturizada de Soja Rosada 1	P15
	Proteína Texturizada de Soja Rosada 2	P23
	Proteína Texturizada de Soja Granulada 1	P20
	Proteína Texturizada de Soja Granulada 2	P27
	Proteína de Soja 1	P16
	Proteína de Soja 2	P17
	Proteína de Soja 3	P18
	Proteína de Soja 4	P19
	Proteína de Soja 5	P21
	Proteína de Soja 6	P22
	Proteína de Soja 7	P24
	Proteína de Soja 8	P25
	Proteína de Soja 9	P26
	Proteína de Soja 10	P28
3	Mortadela de Frango 1	M1
	Mortadela de Frango 2	M2
	Salsicha de Cachorro-quente 1	C6
	Salsicha de Cachorro-quente 2	C4
	Presunto Cozido 1	C1
	Presunto Cozido 2	C5
	Hambúrguer	C2
	Empanado de Frango	C3

Tabela 9: Seqüências dos Iniciadores

Iniciador	Região Alvo	Seqüência	Amplicon	Referencia
LEC1	Lectina	5'-GTGCTACTGACCAAGGCAAACCTCAGCA-3'	164	Vollenhofer <i>et al</i> , 1999
LEC2	Lectina	5'-GAGGGTTTTGGGGTGCCGTTTTTCGTCAAC-3'		
GMO09	CP4 EPSPS	5'- CATGAAGGACCGGTGGGAGAT -3'	447	Meyer & Jaccoud, 1997
GMO05	CaMV 35S	5'- CCACTGACGTAAGGGATGACG -3'		
GMO08	CTP-EPSPS	5'-TGGGGTTTATATGGAAATTGGAA-3'	169	Meyer & Jaccoud, 1997
GMO07	CaMV 35S	5'-ATCCCACTATCCTTCGCAAGA-3'		

Tabela 10: Detecção específica de soja e soja RR por PCR em ingredientes e aditivos

Amostra	Cdgo	Detecção do Gene da Lectina	Detecção específica OGM-Junção 35S/CTP
Blend 1	B1	+	-
Blend 2	B2	-	NR*
Blend 3	B3	+	-
Blend 4	B4	+	-
Blend 5	B5	+	+
Blend 6	B13	+	+
Tempero Linguiça Toscana 1	B6	+	-
Tempero Linguiça Toscana 2	B12	+	-
Tempero Calabresa	B11	+	-
Tempero Patê 1	B7	-	NR
Tempero Patê 2	B9	-	NR
Tempero Patê 3	B15	-	NR
Tempero 1	B8	+	-
Tempero 2	B17	+	+
Saborizante Presunto	B10	+	-
Melhorador de Sabor 1	B14	-	NR
Melhorador de Sabor 2	B16	-	NR
Melhorador de Sabor 3	B18	-	NR
Proteína Texturizada de Soja Rosada 1	P15	+	+
Proteína Texturizada de Soja Rosada 2	P23	+	+
Proteína Texturizada de Soja Granulada 1	P20	+	+
Proteína Texturizada de Soja Granulada 2	P27	+	+
Proteína de Soja 1	P16	+	+
Proteína de Soja 2	P17	+	+
Proteína de Soja 3	P18	+	+
Proteína de Soja 4	P19	+	+
Proteína de Soja 5	P21	+	+
Proteína de Soja 6	P22	+	-
Proteína de Soja 7	P24	+	+
Proteína de Soja 8	P25	+	-
Proteína de Soja 9	P26	+	+
Proteína de Soja 10	P28	+	+
Mortadela de Frango 1	M1	+	-
Mortadela de Frango 2	M2	+	+
Salsicha de Cachorro-quente 1	C6	+	-
Salsicha de Cachorro-quente 2	C4	+	-
Presunto Cozido 1	C1	+	-
Presunto Cozido 2	C5	+	+
Hambúrguer	C2	+	-
Empanado de Frango	C3	+	+

*NR: Não realizado. Uma vez que não foi possível detectar DNA de soja, estas amostras não foram submetidas à detecção de soja RR.

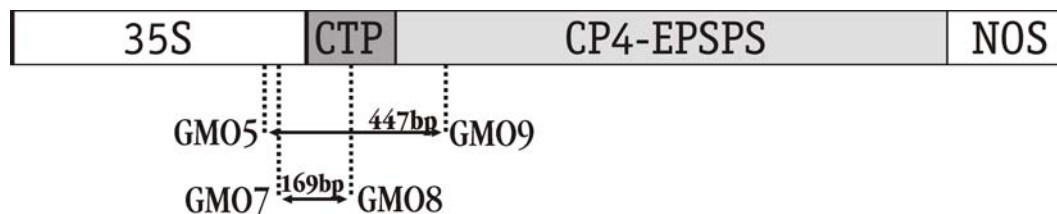


Figura 17. Representação esquemática dos produtos de amplificação do DNA recombinante da soja Roundup ReadyTM com os iniciadores GMO. DNA recombinante, Patente WO 92/04449: gene 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPS), Peptídeo de trânsito ao cloroplasto (CTP), CaMV 35S promotor (35S) e terminador da nopalina sintase (NOS). As setas indicam os comprimentos relativos e as posições dos produtos de amplificação.

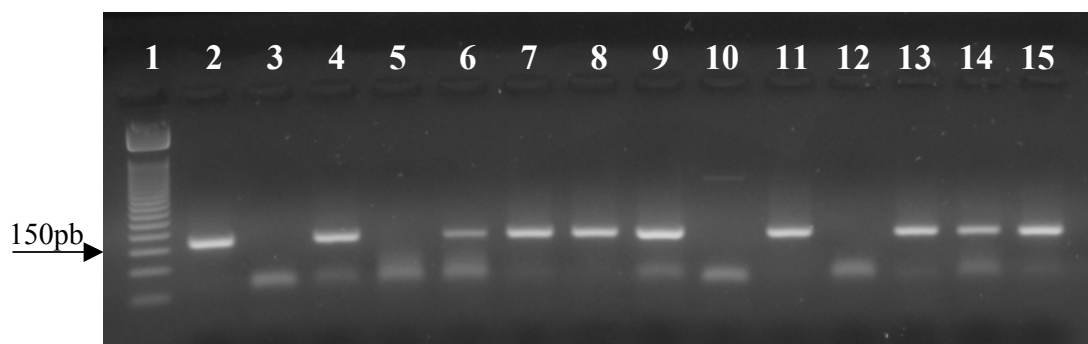


Figura 18. Amplificação do gene da lectina de soja em aditivos cárneos. Canaleta 1: ladder 50 pb (Promega). canaleta 2: controle positivo (DNA de soja), canaleta 3: controle negativo (água), canaleta 4: B1, canaleta 5: B2, canaleta 6: B3, canaleta 7: B4, canaleta 8: B5, canaleta 9: B6, canaleta 10: B7, canaleta 11: B8, canaleta 12: B9, canaleta 13: B10, canaleta 14: B11, canaleta 15: B12. (10 μ L por canaleta).

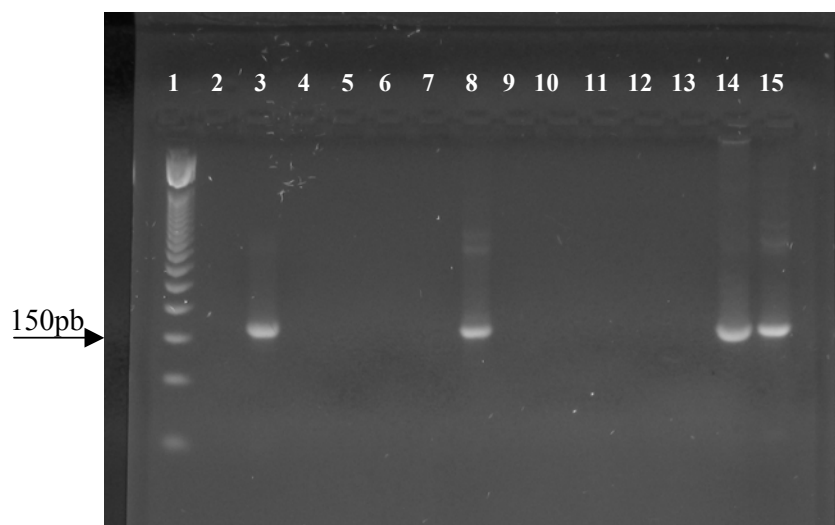


Figura 19. Detecção de soja RR por nested PCR em amostras de aditivos cárneos. Canaleta 1: ladder 50 pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle positivo (soja 0,1% RR); canaleta 4: controle negativo (soja 0% RR); canaletas 4-15: amostras de blends (10 μ L por canaleta).

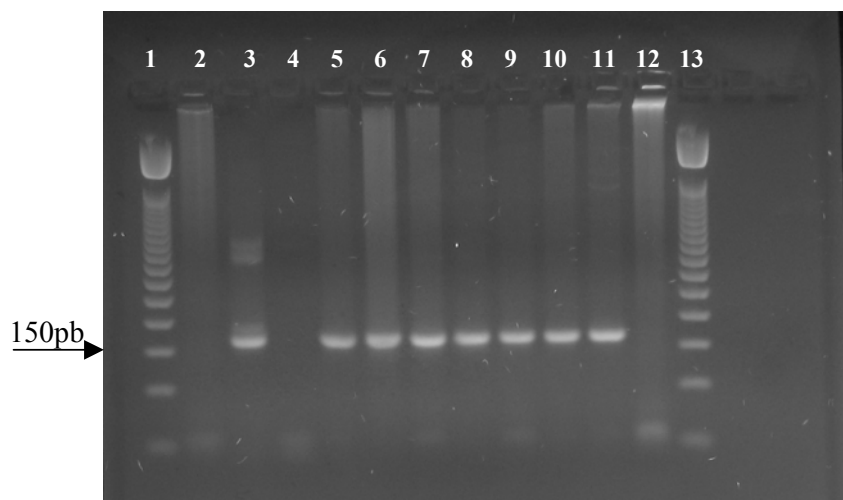


Figura 20. Detecção de soja RR por nested PCR em amostras de proteína isolada de soja utilizada como ingrediente. Canaleta 1: ladder 50 pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle positivo (soja 0,1% RR); canaleta 4: controle negativo (soja 0% RR); canaletas 4-12: amostras de ingredientes de proteína de soja (10 μ L por canaleta), canaleta 13: ladder 50bp (Promega).

5. QUANTIFICAÇÃO DE SOJA ROUNDUP READY EM ALIMENTOS DERIVADOS DE SOJA POR PCR EM TEMPO REAL NO BRASIL

Artigo submetido a Food Control

Fábio Cristiano Angonesi Brod; Ana Carolina Maisonnave Arisi*

*Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346 - 880034-001 -
Florianópolis, SC - Brasil*

*Autor para correspondência. E-mail: arisi@cca.ufsc.br

Resumo

Um aumento significativo da produção de OGMs tem sido observado nos últimos anos. Devido à comercialização de alimentos e ingredientes alimentares derivados de OGMs, os governos de diversos países criaram exigências para utilização e rotulagem de organismos geneticamente modificados. O objetivo deste trabalho foi detectar e quantificar soja GM em alimentos vendidos comercialmente em Florianópolis, Brasil, por PCR. No total sessenta e duas amostras de proteína texturizada de soja e extrato de soja foram analisados. Quarenta amostras apresentaram soja RR em sua composição. Análise quantitativa revelou que apenas duas das quarenta amostras apresentaram conteúdo de soja RR acima de 1%, ou seja, 1,2% e 1,7%. Estes resultados confirmam a presença de soja RR em alimentos derivados de soja no Brasil e que a quantidade de amostras com conteúdo de soja RR acima de 1% diminui quando comparada com dados publicados anteriormente.

Palavras-chave: organismos geneticamente modificados, OGM, detecção, PCR em Tempo Real, alimentos transgênicos.

5.1. Introdução

Nos últimos anos têm-se observado um significativo aumento na produção de OGMs e, como consequência, na produção de alimentos contendo este tipo de matéria-prima. A área total cultivada com lavouras transgênicas em 2004 foi de 81 milhões de hectares, superando

os 67,7 milhões de 2003, um aumento de 20% comparado com os 15% do ano anterior. O principal OGM plantado foi a soja, que ocupou 48,4 milhões de hectares (60% da área total) em 2004. O Brasil, o segundo maior produtor mundial de soja (FAO – Food and Agriculture Organization), aumentou sua área de soja GM em dois terços, passando de três milhões de hectares em 2003 para uma área de cinco milhões de hectares, com outro provável aumento significativo em 2005 (James, 2004). Além disso, a soja é o primeiro OGM aprovado no Brasil para produção e comercialização (Brasil, 2005).

Devido à comercialização de alimentos e ingredientes alimentares derivados de OGMs, governos de diversos países implementaram regulamentos para a utilização e rotulagem de ingredientes derivados de OGMs e anunciaram níveis limites para contaminação não-intencional destes em alimentos: 0,5% na União Européia (Regulamento nº 1829, 2003), 3% na Coreia (CORÉIA, 2000) e 5% no Japão (JAPÃO, 2000). No Brasil, o Decreto nº 4.680 de 24 de abril de 2003, estabelece que tanto os produtos embalados, como os vendidos a granel ou *in natura*, que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, com presença acima do limite de 1% do produto, deverão ser rotulados, e o consumidor deverá ser informado sobre a espécie doadora do gene no local reservado para a identificação dos ingredientes (BRASIL, 2003). Por exemplo, se um produto puro de soja contém mais de 1% de uma variedade de soja transgênica, este deve ser rotulado. Porém, se contiver apenas 0,5%, não há necessidade de rotulagem. Por outro lado, a legislação européia considera o conteúdo de OGM no ingrediente e não somente no produto, conforme a legislação brasileira. Por exemplo, se o produto consistir de apenas 10% de soja e 90% de outros ingredientes, mas 1% da soja presente for GM, seria necessário rotulá-lo, mesmo que em base p/p este contiver menos soja GM que o produto puro acima citado que contém 0,5% de soja GM.

A soja RR evento GTS 40-3-2 foi desenvolvida pela Monsanto e confere tolerância ao herbicida Roundup cujo componente ativo é o glifosato. O DNA recombinante consiste do promotor 35S do vírus mosaico da couve-flor, um peptídeo de trânsito ao cloroplasto (CTP) da *Petunia hybrida*, o gene da 5-eno-piruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) que confere tolerância ao herbicida e um terminador da nopalina sintase do *Agrobacterium tumefaciens* (Padgett *et al.*, 1995; Rott *et al.*, 2004).

A reação em cadeia da polimerase é um dos métodos mais comumente utilizados para detecção da presença de OGMs (Berdal & Holst-Jensen, 2001; Anklam *et al.*, 2002; James *et al.*, 2003; Taverniers *et al.*, 2004). A nested PCR é utilizada para verificar o produto da PCR pela amplificação de um fragmento interno. Esta abordagem em duas etapas melhora a seletividade e sensibilidade da reação (Zimmermann *et al.*, 1998), permitindo que baixos níveis de OGM sejam detectados.

Um dos aspectos mais significativos na análise de OGM é a quantificação, pois o limite máximo permitido de OGM em alimentos está fixado em 1% (Brasil, 2003). Métodos semi-quantitativos e quantitativo-competitivos foram propostos com sucesso (Zimmermann *et al.*, 1998; Studer *et al.*, 1998). Mesmo assim, a aplicação da PCR em Tempo Real (RT-PCR) (Holland *et al.*, 1991; Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996) aumentou significativamente a precisão e a confiança na detecção e quantificação de OGMs em alimentos (Vařtilingom *et al.*, 1999; Berdal & Holst-Jensen, 2001; Terry & Harris, 2001; Höhne *et al.*, 2002; Taverniers *et al.*, 2004; Peano *et al.*, 2004; Rott *et al.*, 2004; Yoshimura *et al.*, 2005). Em contraste com as abordagens que analisam o produto final, a PCR em Tempo Real monitora a reação enquanto esta ocorre. Neste tipo de sistema, a reação é acoplada à emissão de um sinal fluorescente, que é proporcional à quantidade de produtos de PCR produzidos durante a reação. Pelo registro da quantidade de emissão fluorescente em cada ciclo, é possível

monitorar a reação da PCR durante sua fase exponencial. O primeiro aumento da fluorescência corresponde à quantidade inicial de DNA molde. (Vařtilingom *et al.*, 1999).

Os consumidores estão cada vez mais interessados em dietas e alimentos saudáveis, especialmente alimentos e ingredientes derivados de soja, devido ao seu papel na prevenção de várias doenças como cardiovasculares, osteoporose e câncer (Anderson *et al.*, 1999; Bhathena & Velasquez, 2002; Brynin, 2002). Uma vez que a segurança alimentar refere-se, também ao direito do consumidor em saber o que há nos produtos adquiridos, os governos introduziram legislações para rotulagem obrigatória de alimentos que contêm derivados de OGMs para dar aos seus consumidores o direito de escolha (Pan, 2002). O objetivo deste trabalho foi monitorar a ocorrência de soja geneticamente modificada em alimentos derivados de soja comercializados em Florianópolis, Brasil, através de PCR qualitativa e quantitativa.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Amostras

Os 62 produtos derivados de soja foram adquiridos em supermercados de Florianópolis, Brasil. Trinta e sete amostras de Proteína Texturizada de Soja (TSP) e vinte e cinco amostras de Extrato de Soja (PSm) foram analisadas. Materiais de referência certificados do IRMM, Bélgica (0%, 0,1%, 1% e 5% RR), foram utilizados como controles.

5.2.2. Extração de DNA

O DNA foi extraído e purificado de todas as amostras analisadas neste estudo utilizando um método CTAB (Lipp *et al.*, 1999). As concentrações de DNA foram estimadas em espectrofotômetro (Hitachi U 2010).

2.3. PCR Qualitativa

O par de iniciadores LEC1/LEC2, que amplifica um fragmento de 164 pb do gene da lectina da soja, foi utilizado para detectar DNA amplificável de soja (Vollenhofer *et al.*, 1999). Os pares de iniciadores GMO5/GMO9 e GMO7/GMO8 (Meyer & Jaccaud, 1997) foram utilizados para a detecção de soja RR por nested PCR, amplificando um primeiro fragmento de 447 pb e um segundo fragmento de 169 pb; os iniciadores GMO5 e GMO7 são complementares ao promotor CaMV 35S, GMO9 hibridiza-se à sequência do gene CP4 EPSPS e GMO8 à sequência do CTP. As sequências dos iniciadores são listadas na Tabela 11.

As reações de amplificação ocorreram em um volume final de 25 µL contendo tampão de PCR 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polymerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em um termociclador MinicyclerTM (MJ Research, Inc. Watertown, MA) com os seguintes programas: Para os iniciadores LEC1/LEC2: desnaturação inicial a 95°C por 12 min seguida de 50 ciclos de 95°C por 1 min, 62°C por 30 s, e 72°C por 30 s; extensão final a 72°C por 10 min. Para os iniciadores GMO5/GMO9: desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 95°C por 30 s, 65°C por 30 s, e 72°C por 40 s; extensão final a 72°C por 3 min. Após amplificação com os iniciadores GMO5/GMO9, 2

μL do produto da PCR foram utilizados como molde na nested PCR com os iniciadores GMO7/GMO8 e as mesmas condições de reação por 35 ciclos.

5.2.4. Eletroforese em gel de Agarose

Os produtos da PCR (10 μL da reação + 2 μL tampão de carga) foram separados por eletroforese a 400mA e 80V por 50 min em gel de agarose 2,5%, tampão TBE 1X e corados com brometo de etídio. A visualização das bandas ocorreu em um transiluminador UV e as imagens foram fotografadas com câmera digital (Canon Powershot A70).

5.2.5. PCR Quantitativa

Para PCR quantitativa o Kit TaqMan GMO 35S Soy Detection (Applied Biosystems) foi utilizado no sistema de detecção ABI PRISM™ 7500 (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fornecedor. As reações foram realizadas com 125 ng de DNA em um volume final de 50 μL .

5.3. Resultados e Discussão

DNA de TSP e PSm foi extraído e isolado utilizando um método CTAB. Após eletroforese em gel agarose, as amostras apresentaram fragmentos de tamanho reduzido, indicando a degradação do DNA (Figura 21). Isto deve-se, provavelmente, à degradação do DNA durante o tratamento térmico (James et al., 2003; Bauer et al., 2003). As concentrações do DNA extraído variaram de 68 a 513 ng mL^{-1} para TSP e 50 a 353 ng mL^{-1} para PSm. A média das concentrações de DNA e $\text{DO}_{260/280}$ são apresentadas na Tabela 12.

Sessenta e duas amostras de alimentos derivados de soja foram testadas para a presença de DNA de soja RR. Para conferir a presença de DNA de soja e sua amplificabilidade, o par de iniciadores específico para o gene da lectina de soja (le1) LEC1/LEC2 foi utilizado. Todas as amostras apresentaram sinal positivo de tamanho esperado de 164 pb (Figura 22) demonstrando que DNA de integridade suficiente pode ser purificado utilizando-se o método de extração descrito. O método CTAB é preferencialmente utilizado no caso de matrizes alimentares complexas (Olexová et al. 2004; Gryson et al., 2004).

A detecção de soja GM foi baseada nas seqüências únicas encontradas no DNA de soja RR e não em DNA de soja convencional. Todas as amostras com sinal positivo para detecção do gene da lectina foram analisadas para detecção específica de soja RR com os iniciadores GMO5/GMO9. Para confirmar a amplificação específica do fragmento RR, uma nested PCR foi realizada com os iniciadores GMO7/GMO8. Quarenta amostras apresentaram sinal positivo para soja RR, um amplicon de 169 pb, confirmando a presença deste OGM. Para esta combinação de iniciadores, a detecção específica de DNA RR apresentou uma sensibilidade de 0,01% (Brod *et al*, em prelo).

Os resultados das análises qualitativa e quantitativa são apresentados na Tabela 13. Considerando a TSP, vinte e cinco das trinta e sete amostras apresentaram DNA de soja RR em sua composição (Figura 23). Em relação ao PSm, quinze das vinte e cinco amostras apresentaram sinal positivo para soja RR (Brod *et al*, em prelo).

Para determinar o conteúdo de soja RR nas amostras que apresentaram sinal positivo para este OGM, estas foram analisadas por RT-PCR utilizando o TaqMan® GMO 35S Soy Detection KitTM (Applied Biosystems). Em relação ao PSm, nenhuma amostra apresentou conteúdo de soja RR maior que o limite estabelecido pela legislação Brasileira (Figura 24).

Três das quinze amostras positivas apresentaram conteúdo de soja RR menor que 0,01%, isto é, não detectado pela RT-PCR e por esta razão não são apresentadas na Figura 25. A sensibilidade da nested PCR obtida em nossos resultados foi de 0,01% (Brod *et al*, em prelo). A maior parte das amostras (10) apresentou conteúdo de soja RR menor que 0,1%.

Sobre as amostras TSP, apenas duas apresentaram conteúdo de soja RR maior que o estabelecido pela legislação brasileira como contaminação não intencional, apresentando valores de 1,70% e 1,20%. Estas deveriam ser rotuladas com “contém transgênico”. Treze das vinte e cinco amostras apresentaram %RR menor que 0,1% e dez variaram entre 0,12% e 0,8%.

Na literatura científica, há poucos artigos que abordam a distribuição de alimentos derivados de soja GM vendidos comercialmente e apenas dois com dados referentes ao Brasil (Cardarelli *et al*, 2005; Greiner *et al*. 2005). El Sanhoty *et al*. (2002) investigaram a presença de soja RR em uma ampla variedade de amostras comercializadas no mercado Egípcio. Nove das quarenta amostras apresentaram a presença de soja transgênica. Em um estudo de triagem de OGM em vinte e quatro amostras de alimentos do Cairo, Egito, (Oraby *et al.*, 2005), três amostras apresentaram um sinal positivo para a presença do promotor CaMV 35S.

Em um estudo recentemente publicado, Cardarelli *et al*. (2005) apresentaram os resultados de sessenta e seis amostras de alimentos contendo soja. Dezesseis apresentaram um amplicon positivo para detecção específica de soja RR. Seis das treze amostras de PSm apresentaram soja RR em sua composição. Uma amostra de TSP foi analisada e seu resultado foi negativo para este OGM.

Greiner *et al*. (2005) analisaram 100 amostras de alimentos contendo soja no ano 2000 e novamente em 2001. Nas amostras analisadas, a soja RR foi encontrada em 13% e 21%,

respectivamente. Análise quantitativa revelou que em 2000, duas amostras apresentaram conteúdo de soja RR menor que 1%, três amostras apresentaram entre 1 e 4%, quatro amostras entre 4 e 10%, e outras quatro amostras apresentaram conteúdo maior que 10%. Em 2001 a análise quantitativa revelou que três amostras apresentaram conteúdo RR menor que 1%, cinco amostras entre 1 e 4%, seis amostras entre 4 e 10% e sete amostras conteúdo maior que 10%. Em relação à presença de soja RR em alimentos no Brasil, estes são os únicos dados quantitativos publicados até agora.

Com o Decreto nº 4.680 de 24 de Abril de 2003, que estabelece diretrizes para a rotulagem de alimentos e ingredientes que contêm organismos geneticamente modificados, nota-se que a proporção de amostras com valores acima de 1% diminui quando comparada aos dados de Greiner *et al.* (2005) que evidenciaram índices acima de 10% de OGM em um período em que a legislação não permitia valores superiores a 4% (Brasil, 2001). Como resultado, a indústria adaptou-se aos novos padrões estipulados pela legislação vigente, observando as exigências do mercado consumidor.

5.4 Conclusões

Os resultados apresentados neste estudo confirmam que o protocolo CTAB pode ser utilizado para extração e purificação de DNA a partir de Proteína Texturizada de Soja e Extrato de soja, como uma primeira etapa na análise de OGM. Além disso, a nested PCR utilizada neste trabalho é igualmente adequada para detecção de soja RR neste tipo de amostra.

Os resultados do presente trabalho confirmam a presença de soja RR em alimentos derivados de soja, fato esperado uma vez que a soja GM é cultivada no Brasil desde 2000.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq processo 476598/2003-6, Brasil. À Perdigão Agroindustrial S/A unidade de Videira – SC, pela facilidade na utilização do sistema de PCR em Tempo Real. FCAB foi bolsista da CAPES, Ministério da Educação, Brasil.

Referências

Ahmed, F. E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends In Biotechnology*, 20 (5), 215-223.

Anderson, J. W., Smith, B. M., Washnock, C. S. (1999). Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70 (3), 464S-474S.

Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., Van den Eede, G. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food and Research Technology*, 214, 3-26.

Bauer, T., Weller, P., Hammes, W. P., Hertel, C. (2003). The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology*, 217, 338-343.

Bhathena, S. J., Velasquez, M. T. (2002). Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76 (6), 1191-1201.

Berdal, K.G., Holst-Jensen, A. (2001). Roundup Ready® soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *European Food and Research Technology*, 213, 432-438.

Brasil (2001). Decreto nº 3.871, 18 de Julho de 2001. Disciplina a rotulagem de alimentos embalados que contenham ou sejam produzidos com organismo geneticamente modificados, e dá outras providências. *D.O.U. Diário Oficial da União*, Brasília, Brasil.

Brasil (2003). Decreto nº 4.680, 24 de Abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. *D.O.U. Diário Oficial da União*, Brasília, Brasil.

Brasil (2005). Lei nº 11.105, 24 de Março de 2005. Regulamenta os itens II, IV e V da Parágrafo 1º do Artigo 225 da Constituição Federal, provê normas para segurança e mecanismos de inspeção para atividades que envolvam organismos geneticamente modificados. *D.O.U. Diário Oficial da União*, Brasília, Brasil.

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*, em prelo.

Brynin, R. (2002). Soy and its Isoflavones: A Review of their Effects on Bone Density. *Alternative Medicine Review*, 7 (4), 317-327.

Cardarelli, P., Branquinho, M. R., Ferreira, R. T. B., Cruz, F. P., Gemal, A. L. (2005). Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. *Food Control*, 16, 859-866.

Greiner, R., Konietzny, U., Villavicencio, A. L. C. H. (2005). Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control*, 16, 753-759.

Gryson, N., Messens, K., Dewettinck, K., (2004). Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1357-1363.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996). Real-time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986–994.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis. Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026–1030.

Höhne, M., Santisi, C., Meyer, R. (2002). Real-time Multiplex PCR: An accurate method for the detection and qualification of 35S-CaMV promoter in genetically modified maize-containing food. *European Food Research and Technology*, 215, 59-64.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'–3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 88, 7276–7280.

James, C. (2004). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004, ISAAA Briefs, Vol 32; International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications: Ithaca, NY; <http://www.isaaa.org/>.

James, D., Schmidt, A. M., Wall, E., Green, M., Masri, S. (2003). Reliable detection of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5829-5834.

Japan (2000). Notification No. 1775; Food and Marketing Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan: Tokyo, Japan.

Korea (2000). Notification No. 2000-31; Ministry of Agriculture and Forestry of Korea: Seoul, Korea.

Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, 82, 923-928.

Meyer, R. R., Jaccaud, E., (1997). Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans. *Proceedings of the EURO FOOD CHEM IX Conference*, Interlaken, Switzerland, Event No. 220 1:23-28.

Olexová, L., Dovicovicová, L., Kuchta, T. (2004). Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. *European Food and Research Technology*, 218,390-393.

Oraby, H. A. S., Hassan, A. A., Mossallam, A. A. A. (2005). Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3' terminator. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1974-1980.

Padgett, S., Kolacz, K., Delannay, X., Re, D., LaVallee, B., Tinius, C., Rhodes, W., Otero, Y., Barry, G., Eichholtz, D., Peschke, V., Nida, D., Taylor, N., Kishore, G. (1995).

Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science*, 35, 1451-1461.

Pan, T. (2002). Current Status and Detection of Genetically Modified Organism. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (4), 229-241.

Peano, C., Samson, M., Palmieri, L., Gulli, M., Marmioli, N. (2004). Qualitative and Quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6962-6968.

Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament and of the Council.

Rott, M. E., Lawrence, T. S., Wall, E. M., Green, M. J. (2004). Detection and Quantification of Roundup Ready Soy in Foods by Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5223-5232.

El Sanhoty, R., Broll, H., Grohmann, L., Linke, B., Spiegelberg, A., Bögl, K. W., Zagon, J. (2002). Genetically modified maize and soybean on the Egyptian food market. *Nahrung/Food*, 5, 360-363.

Studer, E., Rhyner, C., Lüthy, J., Hübner, P. (1998). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A*, 207, 207-213.

Taverniers, I., Van Bockstaele, E., De Loose, M., (2004). Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1198–1207.

Vařtilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F., Brignon, P. (1999). Real-Time Quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 5261-5266.

Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J., Kroath, H. (1999). Genetically modified organisms in food – Screening and specific detection by polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (12), 5038-5043.

Yoshimura, T., Kuribara, H., Kodama, T., Yamata, S., Futo, S., Watanabe, S., Aoki, N., Iizuka, T., Akiyama, H., Maitani, T., Naito, S., Hino, A. (2005). Applicability of the Quantification of Genetically Modified Organisms to Foods Processed from Maize and Soy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 2052-2059.

Yoshimura, T., Kuribara, H., Kodama, T., Yamata, S., Futo, S., Watanabe, S., Aoki, N., Iizuka, T., Akiyama, H., Maitani, T., Naito, S., Hino, A. (2005). Comparative studies of quantification of genetically modified organisms in foods processed from maize and soy using trial producing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 2060-2069.

Zimmermann, A., Hemmer, W., Liniger, M., Lüthy, J., Pauli U. (1998). A sensitive detection method for genetically modified MaisGardTM corn using a nested PCR-system. *LWT -Food Science and Technology*, 31, 664-667.

Tabela 11: Sequências dos Iniciadores

Iniciador	Região Alvo	Sequência	Amplicon	Referência
LEC1	Gene Lectina	5'-GTGCTACTGACCAAGGCAAACCTCAGCA-3'	164	Vollenhofer <i>et al.</i> , 1999
LEC2	Gene Lectina	5'-GAGGGTTTTGGGGTGCCGTTTTTCGTCAAC-3'		
GMO09	CP4 EPSPS	5'- CATGAAGGACCGGTGGGAGAT -3'	447	Meyer & Jaccoud, 1997
GMO05	Promotor CaMV 35S	5'- CCACTGACGTAAGGGATGACG -3'		
GMO08	CTP-EPSPS	5'-TGGGGTTTATATGGAAATTGGAA-3'	169	Meyer & Jaccoud, 1997
GMO07	Promotor CaMV 35S	5'-ATCCCACTATCCTTCGCAAGA-3'		

Tabela 12: Concentração de DNA e razão $DO_{260/280}$

Alimento derivado de soja	n	[DNA] (ng/ μ L)	$DO_{260/280}$
Proteína Texturizada de Soja	37	162 $\pm$ 87	2,03 $\pm$ 0.2
Extrato de Soja	25	147 $\pm$ 76	1,9 $\pm$ 0.3

Tabela 13: Resultados das análises qualitativa e quantitativa

Amostras	Número de amostras analisadas	Número de amostras positivas para o gene da lectina	Número de amostras positivas para detecção de soja RR	Número de amostras que deveriam ser rotuladas
Proteína texturizada de Soja	37	37	25	2
Extrato de Soja	25	25	15	0

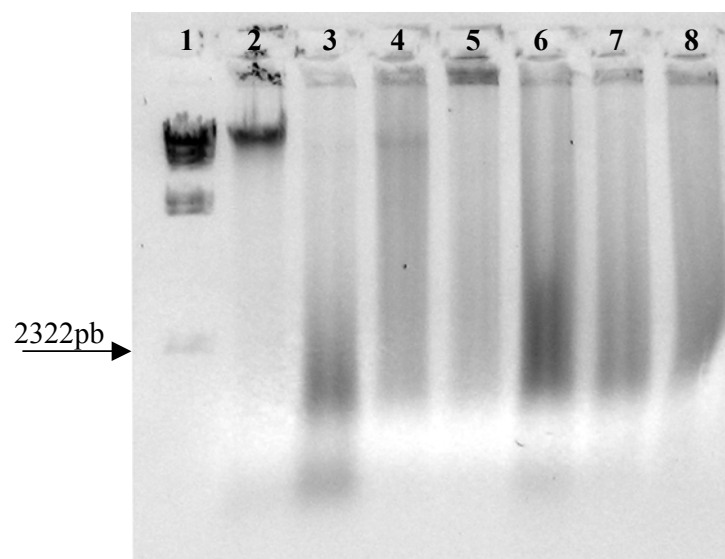


Figura 21. Eletroforese em Gel de Agarose do DNA genômico. Canaleta 1: λ -DNA/HindIII (Invitrogen). Canaleta 2: grão de soja, canaletas 3-5: Amostras de Extrato de Soja, canaletas 6-8: Amostras de Proteína Texturizada de Soja.

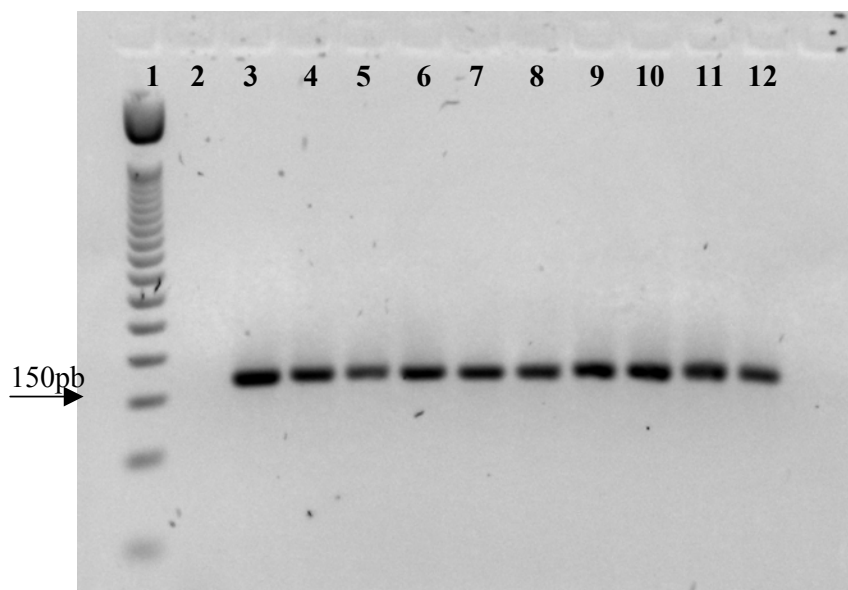


Figura 22. Amplificação do gene da lectina da soja em amostras de Proteína Texturizada de Soja e Extrato de Soja. Lane 1: ladder 50 pb (Promega). Lane 2: controle negativo (água), lane 3: controle positivo (DNA de soja), lanes 4 – 12: Amostras de Proteína Texturizada de Soja, (10 μ L por canaleta).

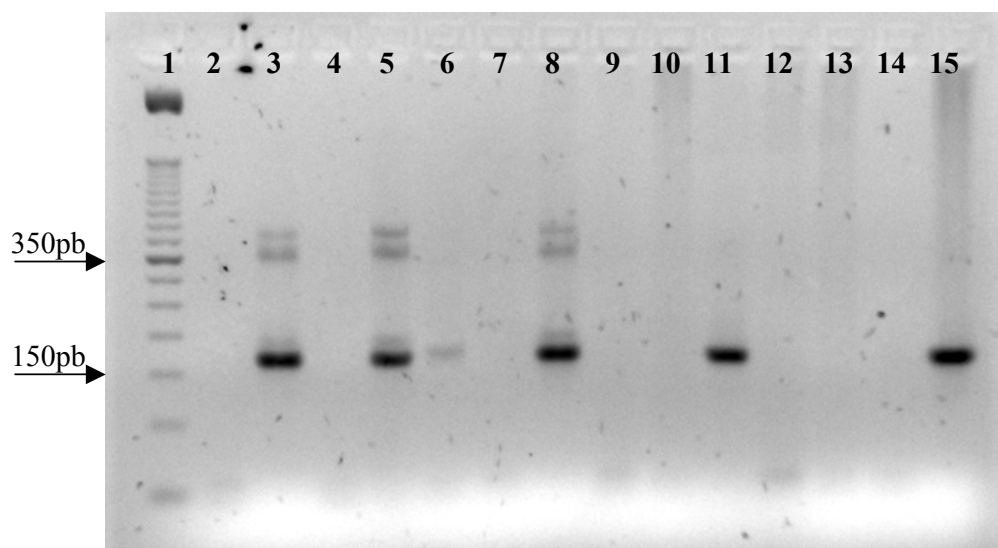


Figura 23. Detecção de soja RR em Proteína Texturizada de Soja por nested PCR. Canaleta 1: ladder 50 pb (Invitrogen); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle positivo (soja 0,1% RR); canaleta 4: controle negativo (soja 0% RR); canaletas 4-15: Amostras de Proteína Texturizada de Soja (10 μ L por canaleta).

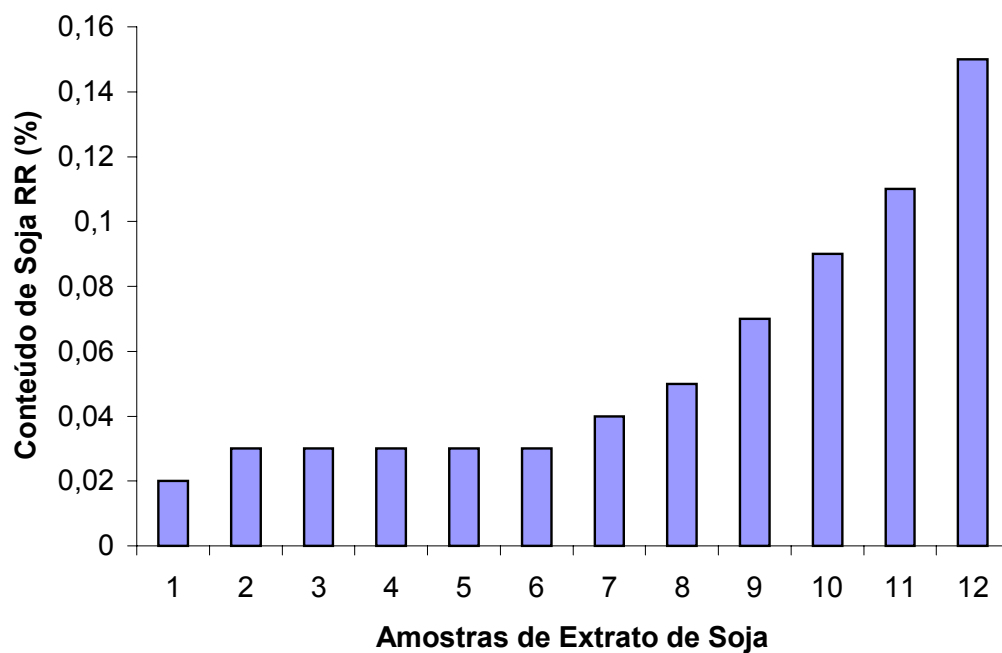


Figura 24. Determinação do conteúdo de soja RR em amostras de Extrato de Soja por PCR em Tempo Real utilizando o TaqMan GMO 35SSoy Detection KitTM no termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems).

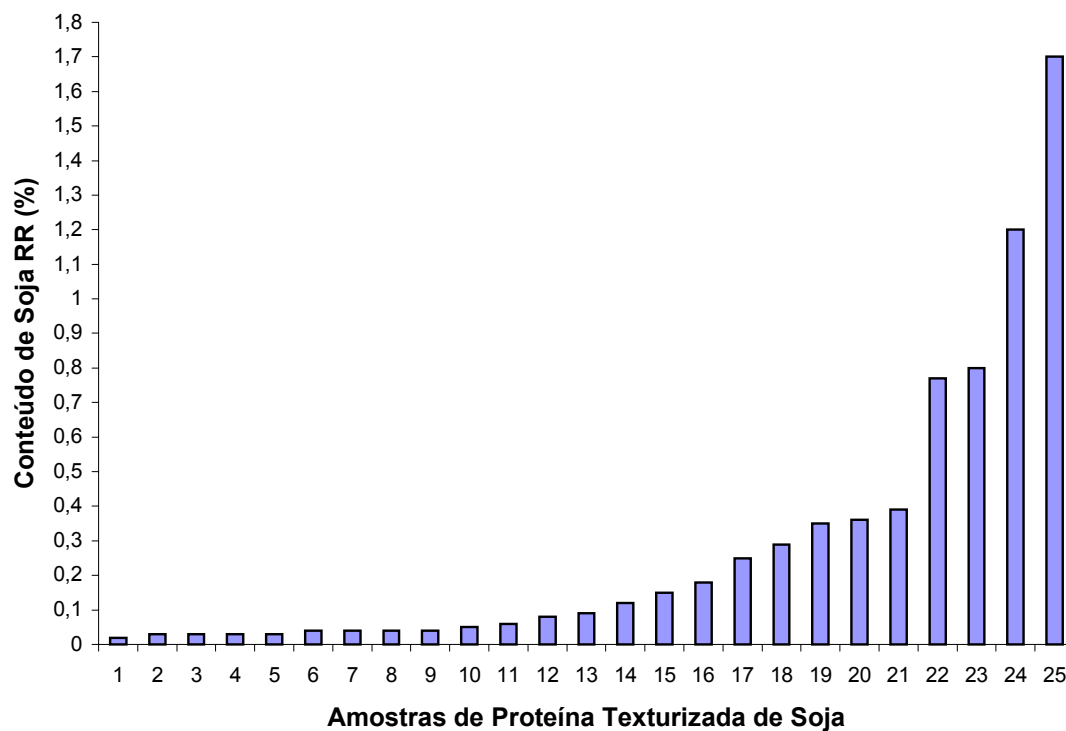


Figura 25. Determinação do conteúdo de soja RR em amostras de PTS por PCR em Tempo Real utilizando o TaqMan GMO 35SSoy Detection KitTM no termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems).

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O método de extração e purificação de DNA utilizado neste estudo mostrou-se adequado para 99 das 106 amostras analisadas. Além disso, os iniciadores LEC1/LEC2, GMO5/GMO9 e GMO7/GMO8 mostraram-se igualmente adequados para a análise qualitativa de DNA de soja e soja Roundup ReadyTM nas amostras analisadas.

Os resultados apresentados neste trabalho confirmam a presença de soja RR em alimentos derivados de soja, aditivos cárneos e produtos cárneos processados contendo soja. De 99 analisadas por nested PCR com iniciadores GMO, 62 amostras apresentaram resultado positivo. Tais dados são esperados, uma vez que a soja GM é encontrada em alimentos comercializados no Brasil desde o ano 2000.

O protocolo de PCR qualitativa utilizado para detecção de soja RR é adequado para triagem de alimentos contendo soja RR. Somente as amostras com resultado positivo precisam ser analisadas por PCR em tempo real. A análise quantitativa de extrato de soja e proteína texturizada de soja revelou apenas duas amostras de PTS em desacordo com a legislação. Partindo da premissa de que o consumidor tem o direito à informação e escolha assegurado e, portanto, de saber o conteúdo presente nos alimentos disponíveis no mercado. Com esse direito assegurado e amparado pelo decreto 4680 que estipula a rotulagem obrigatória de alimentos que contenham acima de 1% de OGM, esses dois produtos deveriam apresentar a inscrição “contém transgênico” no rótulo.

Diante do aumento na comercialização de alimentos contendo OGMs e na tendência à criação e/ou aprovação de novos eventos de transformação, a capacidade de analisar diferentes eventos em uma única etapa torna-se necessária, bem como a existência de métodos oficiais não patenteados e livres de *royalties*.

7. ANEXOS

Sample	GMO Ct	Reference Ct	mean GMO Ct	mean Reference Ct	ΔCt	mean ΔCt	stdev ΔCt	%GMO
L7	-	30,31	#DIV/0!	30,09	#####	#DIV/0!	#VALOR!	#VALOR!
L7	-	29,87			#####			
E5	37,06	27,2	37,35	27,55	9,86	9,8	0,08	0,15
E5	37,64	27,9			9,74			
E6	39,1	27,11	39,385	27,275	11,99	12,11	0,17	0,03
E6	39,67	27,44			12,23			
E9	38,49	25,9	38,665	25,955	12,59	12,71	0,17	0,02
E9	38,84	26,01			12,83			
E10	38,67	26,19	38,67	27,12	12,48	11,55	1,32	0,04
E10	38,67	28,05			10,62			
E11	39,19	26,54	39,26	26,94	12,65	12,32	0,47	0,03
E11	39,33	27,34			11,99			
E12	39,65	27,1	39,65	27,465	12,55	12,185	0,52	0,03
E12	39,65	27,83			11,82			
E14	-	26,05	#DIV/0!	26,585	#####	#DIV/0!	#VALOR!	#VALOR!
E14	-	27,12			#####			
E15	38,03	26,5	38,705	26,69	11,53	12,015	0,69	0,03
E15	39,38	26,88			12,5			
E16	38,31	25,98	38,31	26,265	12,33	12,045	0,40	0,03
E16	38,31	26,55			11,76			
E17	37,85	26,46	38	26,55	11,39	11,45	0,08	0,05
E17	38,15	26,64			11,51			
E18	37,26	26,88	37,615	27,06	10,38	10,555	0,25	0,09
E18	37,97	27,24			10,73			
E19	-	27,06	#DIV/0!	27,76	#####	#DIV/0!	#VALOR!	#VALOR!
E19	-	28,46			#####			
E20	39,08	28,08	39,225	28,37	11	10,855	0,21	0,07
E20	39,37	28,66			10,71			
E21	38,49	27,99	38,62	28,31	10,5	10,31	0,27	0,11
E21	38,75	28,63			10,12			

Tabela 14: Determinação do conteúdo de soja RR em amostras de Extrato de Soja por PCR em tempo real.

Sample	GMO Ct	Reference Ct	mean GMO Ct	mean Reference Ct	ΔCt	mean ΔCt	stdev ΔCt	%GMO
P1	38,89	29,5	38,565	29,465	9,39	9,1	0,41	0,25
P1	38,24	29,43			8,81			
P4	32,33	25,38	32,64	25,75	6,95	6,89	0,08	1,20
P4	32,95	26,12			6,83			
P7	35,57	26,99	35,975	27,475	8,58	8,5	0,11	0,39
P7	36,38	27,96			8,42			
P8	38,55	26,18	38,94	25,865	12,37	13,075	1,00	0,02
P8	39,33	25,55			13,78			
P10	39,32	26,84	39,32	27,15	12,48	12,17	0,44	0,03
P10	39,32	27,46			11,86			
P11	34,6	25,84	34,92	26,305	8,76	8,615	0,21	0,36
P11	35,24	26,77			8,47			
P14	35,03	26,51	35,195	26,54	8,52	8,655	0,19	0,35
P14	35,36	26,57			8,79			
P29	37,21	25,13	37,68	25,45	12,08	12,23	0,21	0,03
P29	38,15	25,77			12,38			
P32	37,48	25,75	37,98	26,61	11,73	11,37	0,51	0,05
P32	38,48	27,47			11,01			
P33	36,68	26,12	37,155	26,62	10,56	10,535	0,04	0,09
P33	37,63	27,12			10,51			
P34	33,51	26,99	34,06	27,665	6,52	6,395	0,18	1,70
P34	34,61	28,34			6,27			
P35	37,2	25,57	37,63	25,535	11,63	12,095	0,66	0,03
P35	38,06	25,5			12,56			
P36	35,78	28,17	35,89	28,375	7,61	7,515	0,13	0,77
P36	36	28,58			7,42			
P37	37,93	26,32	38,255	26,49	11,61	11,765	0,22	0,04
P37	38,58	26,66			11,92			
P38	37,53	25,44	37,29	25,46	12,09	11,83	0,37	0,04
P38	37,05	25,48			11,57			
P40	36,71	27,77	36,635	27,755	8,94	8,88	0,08	0,29
P40	36,56	27,74			8,82			
P42	39,45	27,6	39,45	27,725	11,85	11,725	0,18	0,04
P42	39,45	27,85			11,6			
P43	35,75	28,19	35,745	28,29	7,56	7,455	0,15	0,80
P43	35,74	28,39			7,35			
P44	39,42	27,26	39,555	27,425	12,16	12,13	0,04	0,03
P44	39,69	27,59			12,1			
P45	37,17	26,57	37,66	26,845	10,6	10,815	0,30	0,08
P45	38,15	27,12			11,03			
P46	37,17	27	37,26	27,13	10,17	10,13	0,06	0,12
P46	37,35	27,26			10,09			
P47	37,26	27,56	37,29	27,465	9,7	9,825	0,18	0,15
P47	37,32	27,37			9,95			
P49	39,08	28,04	39,135	27,9	11,04	11,235	0,28	0,06
P49	39,19	27,76			11,43			
P50	39,49	27,13	39,225	27,37	12,36	11,855	0,71	0,04
P50	38,96	27,61			11,35			
P51	38,45	28,56	38,085	28,53	9,89	9,555	0,47	0,18
P51	37,72	28,5			9,22			

Tabela 15: Determinação do conteúdo de soja RR em amostras de PTS por PCR em tempo real.

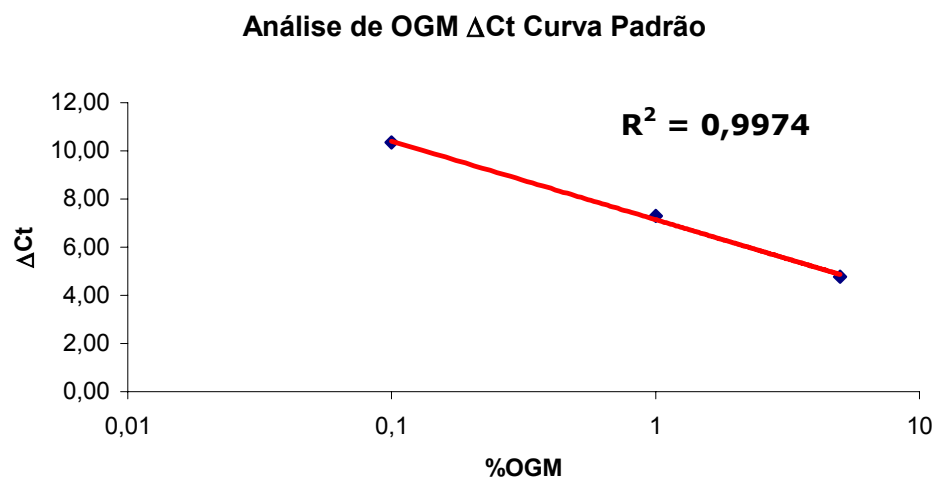


Figura 26: Curva Padrão para determinação do conteúdo de soja RR em amostras de Extrato de Soja e PTS por PCR em tempo real.

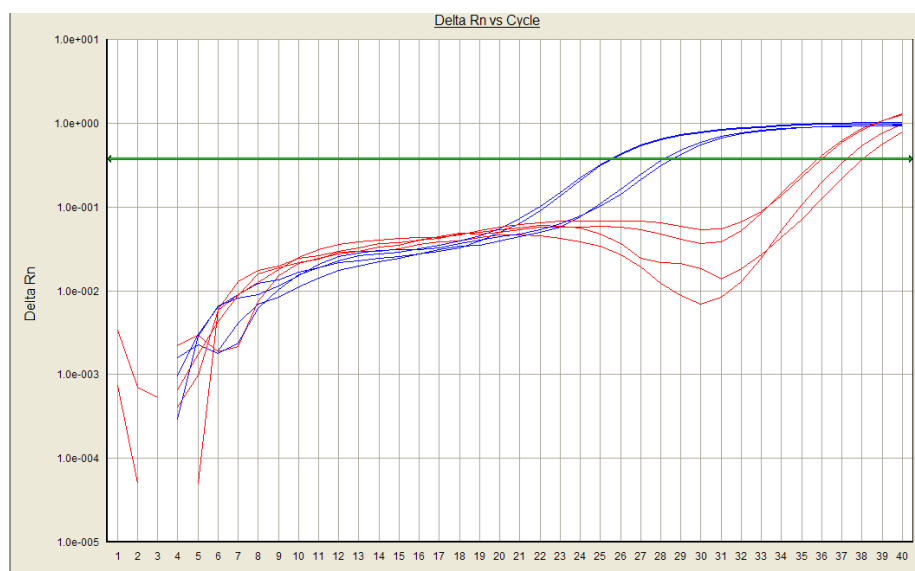


Figura 27: Curvas de amplificação para duas amostras de PTS. As linhas azuis representam as curvas geradas para o gene de referência e as vermelhas representam as curvas geradas para o fragmento transgênico amplificado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOVE – Associação Brasileira de Indústrias de Óleos Vegetais. <http://www.abiove.com.br>, acessado em 14/01/2006.
- AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends In Biotechnology**, V. 20, n.5, p.215-223, 2002.
- ALLMANN, M.; CANDRIAN, U.; LÜTHY, J. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunological methods assuring safety and quality of food: Detection of wheat-contamination in non-wheat food products. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A**, 196, p.248-251, 1993.
- ALLMANN, M.; HÖFELEIN, C. H.; KÖPPEL, E.; LÜTHY, J.; MEYER, R.; NIEDERHAUSER, C.; WEGMÜLLER, B.; CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. **Research in Microbiology**, 146, 85-97, 1995.
- ANKLAM, E.; BATTAGLIA, R. Food analysis and consumer protection. **Trends In Food Science & Technology**, 12, p.197-202, 2001.
- ANKLAM, E.; FERRUCCIO, G. 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.
- 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 OGM analysis. **European Food Research and Technology**, 213, p.432-438, 2001.
- BERK, Z. Technology of Production of Edible Flours and Protein Products From Soybeans. **Fao Agricultural Services Bulletin No. 97**, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1992.
- BRASIL. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a Proteção do Consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 12 de setembro de 1990.

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

BRASIL. Decreto nº 1.752 de 20 de dezembro de 1995. Regulamenta a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, dispõe sobre a vinculação, competência e composição da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 21 de dezembro de 1995.

BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 abril 2003.

BRASIL. Portaria nº 2.658, de 22 de dezembro de 2003. Define o símbolo de que trata o art. 2º, § 1º, do Decreto 4.680, de 24 de abril de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 22 dezembro 2003.

BRASIL. Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005. 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, 28 de março de 2005.

CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction in food microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, 23, p.89-103, 1995.

CORÉIA, Notificação nº 2000-31; Ministério da Agricultura e Silvicultura da Coréia: Seul, Coréia, 2000.

- CRESPO, M. T. B.; PERES, C. M.; PEREIRA, C. I.; RODRIGUES, R. S. Detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Boletim de Biotecnologia**, 69, p.33-37, 2001.
- DEISINGH, A. K.; BADRIE, N. Detection strategies for genetically modified organisms in foods. *Food Research International*, 38, p.639-649, 2005.
- DELANO, J.; SCHMIDT, A.; WALL, E.; GREEN, M.; MASRI, S. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and canola by multiplex PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, p.5829-5834, 2003.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12, p.13-15, 1990.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores em análise genética. 3ª ed. Brasília: **EMBRAPA-CERNAGEN**, 220p, 1998.
- FORTE, V. T.; DI PINTO, A.; MARTINO, C.; TANTILLO, G. M.; GRASSO, G.; SCHENA, F. P.; A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize. **Food Control**, 2004 in press
- GARCÍA-CAÑAS, V.; CIFUENTES, A.; GONZÁLEZ, R. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44, p.425-436, 2004.
- GACHET, E.; MARTIN, G. G.; VIGNEAU, F.; MEYERY, G. Detection of genetically modified organisms (OGMs) by PCR: a brief review of methodologies available. **Trends In Food Science & Technology**, 9, p.380-388, 1999.
- GREINER, R. Methods for identification and quantification of genetically modified material in agricultural crops, processed food and animal feed in relation to regulatory requirements. **Journal of International Biotechnology Law**, 01, p.81-85, 2004.
- GRYSON, N.; MESSENS, K.; DEWETTINCK, K. Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 84, p.1357-1363, 2004.

- HARDEGGER, M.; BRODMANN, P.; HERRMANN, A. Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. **European Food Research Technology**, 209, p.83-87, 1999.
- HERNANDÉZ, M.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; ESTEVE, T.; PRAT, S.; PLA, M. Development of real-time PCR systems based on SYBR Green I, Ampliflour and TaqMan technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA 21. **Analytical Biochemistry**, 323 (2), p.164-170, 2003.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., WILLIAMS, P. M. Real-time quantitative PCR. **Genome Research**, 6, p.986–994, 1996.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. Kinetic PCR analysis. Real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, 11, p.1026–1030, 1993.
- HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R., GELFAND, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 50–30 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, 88,7276–7280.
- HÖHNE, M., SANTISI, C., MEYER, R. (2002). Real-time Multiplex PCR: An accurate method for the detection and qualification of 35S-CaMV promoter in genetically modified maize-containing food. **European Food Research and Technology**, 215, 59-64.
- HOLST-JENSEN, A.; RÖNING, S. B.; LÖVSETH, A.; KNUT, G. B.; PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 375, p. 985-993, 2003.
- HÜBNER, P., BURGNER, M., & LÜTHY, J. (1997). Application of molecular biology for the identification of fish. In R. Amado, R. Battaglia (Eds.), **Proceedings of the ninth european conference on food chemistry** (Vol. 1), Authenticity and adulteration of food: the analytical approach, 24-26 September 1997, Interlaken (pp. 49-54).
- HÜBNER, P.; STUDER, E.; LÜTHY, J. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. **Food Control**. V. 10, p.353-358, 1999a.

- HÜBNER, P.; STUDER, E.; HÄFLIGER, D.; STADLER, M.; WOL, C.; LOOSER, M. Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. **Accreditation and Quality Assurance** V. 4, p.292-298, 1999b.
- 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.
- IDEC – Instituto de Defesa do Consumidor. <http://www.idec.org.br/cdc.asp>, acessado em 16/01/2006.
- JAMES, D.; SCHMIDT, A.; WALL, E.; GREEN, M.; MASRI, S. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and canola by multiplex PCR analysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** V. 51, p5829-5834, 2003.
- JAMES, C. (2004). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004, ISAAA Briefs, Vol 33; International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications: Ithaca, NY; <http://www.isaaa.org/> acessado em 12/12/2005.
- JAMES, C. (2005). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2005, ISAAA Briefs, Vol 34; International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications: Ithaca, NY; <http://www.isaaa.org/> acessado em 16/02/2006.
- JANKIEWICZ, A.; BROLL, H.; ZAGON, J. The official method for the detection of genetically modified soybeans (German Food Act LMBG § 35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistant Bt maize (Maximizer). **European Food Research and Technology**. V. 209, p.77-82, 1999.
- JAPÃO, Notificação nº1775; Agência de Alimentos e Comércio, Ministério da Agricultura, Silvicultura e Pesca do Japão: Tóquio, Japão, 2000.
- KNUT, B., 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 analysis. **European Food Research and Technology**, 213, p. 432:438, 2001.
- LAJOLO, F. M.; NUTTI, M. R. transgênicos: bases científicas da sua segurança. **Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, 2003.

- LEITE, M. Os Genes da Discórdia – Alimentos transgênicos no Brasil. **Parcerias Estratégicas**, v.10, p. 175-185, 2002.
- LEVIN, R. E.; The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. **Food Biotechnology**, v.18, n1, p.97-133, 2004.
- LÜTHY, J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. **Food Control**. V. 10, p.359-361, 1999.
- MAGIN, K.; MIHALIAK, C.; SOMERVILLE, L.; PRIVALLE, L.; CHARLTON, S.; PORTER, L. Methods for detection of GMO grain in commerce. **American Crop Protection Agency**, 2000. Disponível em <http://www.acpa.org>, capturado em 10/12/2004.
- 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, n3, p.275-296, 2004.
- MATSOUKA, 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**. 40, pp 149-157, 1999.
- MEYER, R., CANDRIAN, U., & LÜTHY, J. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International**, 77, 617-622, 1994.
- MEYER, R., HÖFELEIN, CH., LÜTHY, J., & CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. **Journal of AOAC International**, 78, 1542-1551, 1995.
- MEYER, R. Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction PCR using the Flavr Savr tomato as an example **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A**, 201, 583-586, 1995a.
- MEYER, R. Detection of genetically engineered food by the polymerase chain reaction (PCR) **Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.**, 86, 648-656, 1995b.
- MEYER, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of OGMs in food. **Food Control**. V. 10, p.391-399, 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 und –Forschung A.**, 203, 339-344, 1996.
- MEYER, R. and JACCAUD, E. Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. In: Amado, R. Battaglia (Eds.), **Proceedings of the EURO FOOD CHEM IX Conference (v.1)**, Interlaken, Switzerland, p.23-28, 1997.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br>, acessado em 14/02/2006.
- MORRISON, T. B.; WEIS, J. J.; WITTEWER, C. T.; Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **BioTechniques**, v.24, p.954-962, 1998.
- NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, EMBRAPA, Brasília, v.18, n.1, p. 81-116, jan/abr, 2001.
- NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar (Biossegurança de plantas transgênicas). **Revista de Nutrição**. V. 16, n.1, p.105-116, 2003.
- ODA, L. M.; SOARES, B. E. C. Biotecnologia no Brasil: Aceitabilidade pública e desenvolvimento econômico. **Parcerias Estratégicas**, n.10, p. 162-173, 2001.
- OLEXOVÁ, L., DOVICOVICOVÁ, L., KUCHTA, T. Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. **European Food Research and Technology**, 218,390-393, 2004.
- ORABY, H. A. S.; HASSAN, A. A.; MOSSALAM, A. A. A. Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3' terminator. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 85, p.1974-1980, 2005.
- PADGETTE, S., KOLACZ, K., DELANNAY, X., RE, D., LAVALLEE, B., TINIUS, C., RHODES, W., OTERO, Y., BARRY, G., EICHHOLTZ, D., PESCHKE, V., NIDA, D.,

- TAYLOR, N., KISHORE, G. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, 35, 1451-1461, 1995.
- PAN, T. Current Status and Detection of Genetically Modified Organism. **Journal of Food and Drug Analysis**, 10 (4), 229-241, 2002.
- PAN, T.; SHIH, T. Detection of genetically modified soybeans in miso by Polymerase Chain Reaction and nested Polymerase Chain Reaction. **Journal of Food and Drug Analysis**, v11, n2, p.154-158, 2003.
- PEANO, C.; SAMSOM, M. C.; PALMIERI, L.; GULLI, M.; MARMIROLI, N. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, p6962-6968, 2004.
- QUERCI, M.; MAZZARA, M. Session 7: Characteristics of Roundup Ready Soybean®, MON810 Maize, and Bt-176 Maize. In: **The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms**. User manual. **Joint Research Centre**, Ispra, 2004. Disponível na internet: <http://gmotraining.jrc.it/docs/session%2007.pdf> acessado em 15/10/2005.
- ROTT, M. E., LAWRENCE, T. S., WALL, E. M., GREEN, 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**, 52, 5223-5232, 2004.
- Regulamento (EC) N°1829/2003 do Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia de 22 de setembro, 2003. Disponível na internet: http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2003/l_268/l_26820031018en00010023.pdf acessado em 16/01/2006.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S. J.; FALOONA, F., MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H.A. & ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230:1350 – 1354, 1985.
- SHEEY, R. E.; KRAMER, M.; HIATT, W. R.; Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** V.85, p8. 805-8809, 1988.

- SCHREIBER, G. A. Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods. **Food Control**, V. 10, p. 351-352, 1999.
- SKERRITT, J. H. Genetically modified plants: developing countries and the public acceptance debate. **AgBiotechNet**, v.2, p. 1-8, 2000.
- SMITH C. J. S.; WATSON, C. F.; MORRIS, P. C.; BIRD, C. R.; MORRIS, P. C.; SCHUCH, W. GRIERSON, D. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. **Nature** 334 P. 724-726, 1988.
- SOMMA, M. Session 4: Extraction and Purification of DNA. In: **The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms**. User manual. **Joint Research Centre**, Ispra, 2004. Disponível na internet: <http://gmotraining.jrc.it/docs/session%2004.pdf> acessado em 15/10/2005.
- SOMMA, M.; QUERCI, M. Session 6. The Polymerase Chain Reaction (PCR) In: **The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms**. User manual. **Joint Research Centre**, Ispra, 2004. Disponível na internet: <http://gmotraining.jrc.it/docs/session%2006.pdf> acessado em 15/10/2005.
- STUDER, E.; RHYNER, C.; LÜTHY, J.; HÜBNER, P. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A**. V. 207, p.207-213, 1998.
- TAVERNIERS, I., VAN BOCKSTAELE, E., DE LOOSE, M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 378, 1198–1207, 2004.
- TAYLOR, N. B.; ROY, L. F.; MACDONALD, J.; SHARIFF, A.; PADGETTE, S. R. Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** V. 47, p.4469-4473, 1999.
- TENGEL, C.; SCHÜßLER, P.; SETZKE, E.; BALLES, J.; SPRENGER-HAUßELS, M. PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. **BioTechniques** 31, p.426-429, 2001.

- TERRY, C. F.; HARRIS, N. Event-specific detection of Roundup Ready soya using two different real time PCR detection chemistries. **European Food Research and Technology**, 213, p.425-431, 2001.
- TRAPMANN, S.; SCHIMMEL, H.; KRAMER, G. N.; VAN DEN EEDE, G.; PAULWELS, J. Production of certified reference materials for the detection of genetically modified organisms. **Journal of AOAC International**. V.85, nº3, p775-779, 2002.
- VAÏTILINGOM, M., PIJNENBURG, H., GENDRE, F., BRIGNON, P. Real-Time Quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 47, 5261-5266, 1999.
- VAN DUIJN, G.; VAN BIER, R.; BLEEKER-MARCELIS, H.; PEPPELMAN, H.; HESSING, M.; Detection methods for genetically modified crops. **Food Control**. V. 10, p375-378, 1999.
- 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**, v15, n7, p.767-774, 1998.
- 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** 47, pp 5038-5043, 1999.
- 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, n2, p.132-138, 2005.
- WEIGHARDT, F. Session 10. Quantitative PCR for the detection of GMOs. In: **The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms**. User manual. **Joint Research Centre**, Ispra, 2004. Disponível na internet: <http://gmotraining.jrc.it/docs/session%20010.pdf> acessado em 15/10/2005.
- WINDELS, P.; TAVERNIERS, I.; DEPICKER, A.; BOCKSTAELE, E. V.; DE LOOSE, M. Characterization of the Roundup Ready soybean insert. **European Food Research and Technology**. V. 213, p.107-112, 2001.

- WOLF, C.; SCHERZINGER, M.; WURZ, A.; PAULI, U.; HÜBNER, P.; LÜTHY, J.
Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. **European Food Research and Technology**. V. 210, p.367-372, 2000.
- ZIMMERMANN, A.; LÜTHY, J.; PAULI, U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A**. V. 207, p.81-90, 1998.
- YOSHIMURA, T., KURIBARA, H., KODAMA, T., YAMATA, S., FUTO, S., WATANABE, S., AOKI, N., IIZUKA, T., AKIYAMA, H., MAITANI, T., NAITO, S., HINO, A. (2005a). Applicability of the Quantification of Genetically Modified Organisms to Foods Processed from Maize and Soy. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53, 2052-2059.
- YOSHIMURA, T., KURIBARA, H., KODAMA, T., YAMATA, S., FUTO, S., WATANABE, S., AOKI, N., IIZUKA, T., AKIYAMA, H., MAITANI, T., NAITO, S., HINO, A. (2005b). Comparative studies of quantification of genetically modified organisms in foods processed from maize and soy using real time PCR. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53, 2060-2069.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)