UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação da metodologia de detecção e quantificação por PCR
em tempo real de organismos geneticamente modificados em
alimentos: aspectos de produção, processamento e
amostragem

Denise Mayumi Cobaiashi

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Flavio Finardi Filho

São Paulo
2012

Denise Mayumi Cobaiashi

Avaliação da metodologia de detecção e quantificação por PCR em tempo real de organismos geneticamente modificados em alimentos: aspectos de produção, processamento e amostragem

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ao meu pai e minha mãe, pelo lar feliz e
seus esforços durante toda uma vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, pelas oportunidades, compreensão e conhecimentos compartilhados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pelo enriquecimento científico em tão curto período.

À Nestlé Quality Assurance Center e equipe, em especial, a Carlos Eduardo Lima e Sônia Maria Oliveira, pelo incentivo e pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao Dr. Geoffrey Cottenet e Dra. Carine Gostely-Blancpain do Nestlé Research Center, pela amizade e conhecimentos adquiridos.

A Pedro Felipe Angelini por seu companheirismo e amor.

*"No fundo de um buraco ou de um poço,
acontece descobrir-se as estrelas."*

Aristóteles

RESUMO

COBAIASHI, D. M. **Avaliação da metodologia de detecção e quantificação por PCR em tempo real de organismos geneticamente modificados em alimentos: aspectos de produção, processamento e amostragem.** 2012. 87f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O recente crescimento da produção de organismos geneticamente modificados (OGM) no mundo tem demandado novas políticas de controle de plantio e comercialização de produtos alimentícios produzidos com ingredientes GM. Vários aspectos influenciam a análise de detecção e quantificação de OGM em alimentos, e em última instância, o monitoramento e atendimento à legislação e rotulagem. Este estudo se propôs a avaliar três destes aspectos, através da metodologia de análise de PCR em tempo real: a degradação de DNA e a presença adventícia de culturas GM e não-GM, ambas decorrentes da produção e processamento dos grãos em matérias-primas e produtos para consumo, bem como os planos de amostragem existentes para coleta de material alimentício destinado às análises de OGMs. Resultados demonstraram que os processos de fabricação degradam o material genético em diferentes graus em algumas matrizes de alimentos, viabilizando ou não, a análise por PCR em tempo real. Na cadeia de manufatura de subprodutos de soja, milho, arroz e trigo, 45% das amostras apresentaram detecção para uma cultura diferente da principal, sendo 44% deste total, GM. A adoção de metodologias de análise que se restringem à detecção de poucos genes-alvo, ou aplicadas somente a amostras compostas de soja ou milho, já não são mais suficientes para o rastreamento e quantificação dos alimentos contendo matérias-primas geneticamente modificadas. O plano de amostragem proposto foi representativo e delineado sob medida para avaliação de bebida à base de soja produzida em escala industrial, porém mais matrizes necessitam ser testadas para uma avaliação global das estratégias de amostragem.

Palavras-chave: DNA, Organismos Geneticamente Modificados, alimentos GM, PCR em tempo real, amostragem.

ABSTRACT

COBAIASHI, D. M. **Evaluation of real-time PCR detection and quantification methodology of genetically modified organisms in food: production, processing and sampling aspects.** 2012. 87f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The recent increase in genetically modified organisms (GMO) production is requiring new control policies for cultivation and commercialization of food products containing GM ingredients. There are many factors that can influence detection and quantification of GMO ingredients in food products, and these can ultimately influence the monitoring, labeling and legislation observance. In this work, we intended to evaluate three of these factors, using real-time PCR analysis method: DNA degradation; adventitious presence of GM and non-GM cultures, both caused by grain production and raw materials and finished products processing; and the available sampling plans for the collection of food material for GM analysis. Results in some food matrices showed that the manufacturing processes can degrade the genetic material in different degrees, allowing or not, the real-time PCR analysis. Regarding the soya beans, maize, rice and wheat manufacturing chains, 45% of the samples presented positive detection for a secondary crop, of which 44% were GM. The adoption of analysis methodologies restricted to a few target-genes, or applied solely to samples composed by soya or maize is simply not enough for tracking and quantification of food containing GM raw material. The sampling plan was representative and fit-for-purpose for one tested soya-based beverage and produced in industrial scale, however, more lots and matrices need to be analyzed for a global evaluation of the sampling strategies.

Key words: DNA, Genetically Modified Organisms, GM food, real-time PCR, sampling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1. Construções dos genes para modificação genética de milho MON810 (A) e soja RRS (B)..	13
Figura 2. Moagem úmida do milho. Adaptado de OECD (2002).	18
Figura 3. Moagem seca do milho. Adaptado de OECD (2002).	19
Figura 4. Cadeia de processamento da soja. Adaptado de OECD (2002).	20
Figura 5. Esquema de amostragem de matérias-primas segundo plano CEN/TS 15568.	31
Figura 6. Grau de pureza do DNA extraído para cada tipo de matriz.	45
Figura 7. Detecção dos genes da lectina (soja), zeína (milho), prolamina (arroz) e W-pepCi1 em amostras cujas matrizes principais são soja, milho, arroz, trigo ou culturas variadas.	53
Figura 8. Curvas padrão para o gene endógeno marcado com a fluorescência FAM e para o gene exógeno marcado com a fluorescência VIC para a reação de quantificação das amostras da coleta 1 (a), coleta 2 (b) e coletas 3 (c).	55
Figura 9. Variação da quantificação relativa de soja GM RRS em 10 amostras de bebida UHT à base de soja “original” coletadas em diferentes horários	58
Figura 10. Cálculo de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk dos valores da coleta 1 (a), 2 (b) e 3 (c).	60
Figura 11. Detecção e quantificação de OGMs em amostras com diferentes concentrações de soja e milho.	66
Tabela 1. Sequências de 9 conjuntos de <i>primers</i> e sondas para nove alvos diferentes.	35
Tabela 2. Cálculo de excedente de coleta das 168 amostras de matérias-primas e produtos terminados após aplicação do plano de amostragem proposto.	42
Tabela 3. Rendimento de DNA das amostras obtido pela leitura a 260nm em espectrofotômetro.	44
Tabela 4. Reações de especificidade para os genes-alvo lectina, zeína, prolamina, WpepCi1, hsp-cry1Ab e CTP4 por PCR em tempo real.	46
Tabela 5. Amostras com amplificação positiva para os genes-alvo lectina, zeína, prolamina, WpepCi1, hsp-cry1Ab e CTP4 por PCR em tempo real.	47
Tabela 6. Comparação entre as detecções em porcentagem para a cultura principal (GM e não-GM), e para uma ou mais culturas (GM e não-GM) diferentes da principal.	51
Tabela 7. Cálculo de quantificação relativa das amostras a partir dos valores de inclinação de reta e intersecção de reta das curvas padrão do gene exógeno (FAM) e gene endógeno (VIC).	56
Tabela 8. Cálculo de teste t-Student bicaudal para uma amostra.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADN ou DNA – Ácido desoxirribonucleico
ANOVA – Análise de variância
AOSCA – Associação das Agências Oficiais de Certificação de Sementes
bp – pares de bases
(milho ou soja) BT – (milho ou soja com proteína do) *Bacillus thuringiensis*
CDB – Convenção de Diversidade Biológica
C_T – *Cycle threshold*
CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio
CV – Coeficiente de variação
EC – European Commission
ELISA - Ensaio imunoenzimático
EPA – Environmental Protection Agency
EPSPS – 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase
FAM – Corante repórter 6-carboxifluoresceína
FDA – Food and Drug Administration
FISCORGEN – Programa de Fiscalização de Atividades com Organismos Geneticamente Modificados
GM – Geneticamente modificado
HPSF – Highly purified salt free
IFL – Imunoensaio de fluxo lateral
IRMM – Institute of Reference Materials and Measurements
ISAAA – Institute International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
ISO – International Organization for Standardization
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MGB – *Minor Grooving Binding*
NFQ – *Non-fluorescent quencher*
OECD – Organization for Economic Cooperation and Development
OGM – Organismos geneticamente modificados
P-35S – Promotor do vírus do mosaico da couve-flor
PCR – Reação em cadeia de polimerase
RRS – Roundup Ready
Taq – *Thermophilus aquaticus*
T_m – Temperatura de melting
T-nos – Sintetase de nopalina
USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UV – Ultravioleta
VIC – Corante repórter fluorescente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Legislação acerca dos OGMs	14
1.2	Metodologias de análise de OGMs	15
1.3	Processamento dos alimentos e a degradação do DNA	17
1.4	Amostragem	23
1.5	Produção e contaminação adventícia de grãos	26
2	OBJETIVO GERAL	28
2.1	Objetivos específicos	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Materiais	29
3.1.1	Seleção das amostras	29
3.2	Métodos	30
3.2.1	Definição do plano de amostragem	30
3.2.2	Preparação das amostras	32
3.2.3	Extração de DNA	32
3.2.4	Verificação da quantidade e pureza do DNA	33
3.2.5	Seleção das sequências-alvo	33
3.2.6	Pré-amplificação do DNA por PCR	36
3.2.7	Análise qualitativa por PCR em tempo real	37
3.2.8	Análise quantitativa por PCR em tempo real	38
3.2.9	Avaliação dos resultados	39
3.2.9.1	Degradação do DNA decorrente do processamento dos alimentos	39
3.2.9.2	Presença adventícia entre culturas não-GM e GM	40
3.2.9.3	Amostragem	40
4	RESULTADOS	42
4.1	Plano de amostragem e coleta de amostras	42
4.2	Extração e determinação da concentração de DNA	43
4.3	Determinação da pureza do DNA	45
4.4	Especificidade dos <i>primers</i> e sondas	46
4.5	Análises de PCR em tempo real	46
4.6	Avaliação de contaminação entre culturas	50
4.7	Resultados de análises quantitativas das amostras individuais e amostra global	54
5	DISCUSSÃO	61
5.1	Extração e rendimento de DNA de amostras de alimentos com diferentes graus de processamento e a performance da análise de PCR em tempo real	61
5.2	Contaminação por presença adventícia não-GM e GM nos alimentos à base de soja, milho, arroz e trigo	63
5.3	Amostragem	68
5.4	Quantificação relativa e eventos piramidados	70
5.5	Considerações finais	72
6	CONCLUSÕES	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8	APÊNDICES	82

1 INTRODUÇÃO

No cenário mundial, várias técnicas têm sido aplicadas no melhoramento dos produtos agrícolas destinados à fabricação de alimentos, no que diz respeito à sua produção, qualidade e funcionalidade. Uma dessas técnicas é a recombinação gênica, que permite a manipulação, modificação e inserção de genes de organismos distintos para a expressão de características novas ou melhoradas.

Os primeiros organismos geneticamente modificados (OGM) surgiram na década de 70, quando Cohen e Boyer conseguiram transferir um gene de rã para uma bactéria (COHEN et al., 1973), após estudos sobre a troca de plasmídios entre bactérias. Logo a comunidade científica reconheceu não apenas os benefícios em potencial oriundos da engenharia genética, mas também os riscos que essa nova tecnologia apresentava (BERG et al., 1974). Em relação às plantas transgênicas, o primeiro relato foi publicado pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) em 1982, e desde então, vários tipos de culturas vegetais passaram a ser manipuladas geneticamente (MCHUGHEN, 2007).

As principais características introduzidas em vegetais geneticamente modificados (GM) visam culturas mais produtivas, alimentos de melhor qualidade e mais seguros. Atualmente existem estudos voltados ao desenvolvimento de plantas coma tolerância a herbicidas, resistência a insetos e a vírus, resistência à salinidade e à seca, aumento da eficiência do uso de nitrogênio e melhoria de algumas características nutricionais.

O último relatório da ISAAA (JAMES, 2011) aponta que em 2010, 81% das áreas com cultivos de soja no mundo eram GM, de um total de 90 milhões de hectares, enquanto que o algodão GM ocupava mais da metade (64%), o milho mais que um quarto (29%), e a canola em quarto lugar, com 23% da área cultivada. No total, as culturas GM ocuparam em 2010 cerca de 148 milhões de hectares, e sua adoção cresceu 87% entre 1996 e 2010, sendo 10% entre 2009 e 2010, principalmente por produtores de pequena escala. As culturas GM estão presentes em 29 países do mundo, 10 se concentrando nas Américas do Sul e Central. Países em desenvolvimento representam 48% em área total de plantio de culturas GM em

2010, e deverão ultrapassar os países desenvolvidos antes de 2015, com destaque para a China e a Índia na Ásia, Brasil e Argentina na América Latina, e a África do Sul no continente africano.

Em 2009 o Brasil passou a ser o segundo maior produtor de OGMs no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, e manteve essa posição em 2010, apresentando um crescimento anual de 19% da área GM plantada, o maior dentre os vinte e cinco países produtores de culturas GM no mundo. Durante 2010, 8 culturas GM foram aprovadas para plantio e comercialização, somando-se às 19 já aprovadas no país. Em 2010 as culturas transgênicas totalizaram uma área 25,4 milhões de hectares, divididos em plantios de soja, milho e algodão (JAMES, 2011). Em 2011 destacou-se no país a aprovação do primeiro feijão GM desenvolvido pela EMBRAPA (CTNBio, 2011).

Entre as culturas GM no Brasil, destacam-se a soja GM Roundup Ready ou GTS 40-3-2 e o milho MON810 ou YieldGard, ambos de grande abrangência em área cultivada. A soja GM RRS foi aprovada primeiramente nos Estados Unidos em 1994. É atualmente comercializada em vários países, e no Brasil foi aprovada em 1998 (MCT, 1998). Dentre as safras de 2009/2010, a soja GM RRS representava cerca de 16,2 milhões de um total de 22,9 milhões de hectares plantados, equivalente a 71% em área (JAMES, 2010). No mundo, o milho GM MON810 possui aprovação em diversos países, sendo os Estados Unidos os pioneiros na sua comercialização em 1995. No Brasil, esta variedade foi aprovada pela CTNBio em 2007 (MCT, 2007). Em 2009, o milho Bt ocupou cerca de 5 milhões de hectares de um total de 13 milhões cultivados no país (JAMES, 2010).

A soja GM RRS foi desenvolvida pela empresa Monsanto para tolerância ao herbicida glifosato, através da incorporação da enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS) isolada da bactéria de solo *Agrobacterium tumefaciens* linhagem CP4, através de técnicas de biobalística. A enzima EPSPS é um subproduto na cadeia de produção de compostos aromáticos nas plantas, e está normalmente presente em alimentos derivados de fontes vegetais e microbianas (CERA, 2011).

A. MON810

B. RRS

Figura 1. Construções dos genes para modificação genética de milho MON810 (A) e soja RRS (B). A figura é uma representação esquemática sem proporção de tamanho em pares de bases. Adaptado de SHRESTHA et al., 2008 (A) e de PADGETTE et al., 1995 (B).

O plasmídeo PV-GMGT04, usado na transformação, carrega genes codificantes para tolerância ao glifosato e para a produção de β -glucoronidase (gene *gus*). A expressão do gene CP4EPSPS é regulado pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), um peptídeo do trânsito do cloroplasto (CTP4) da *Petunia hybridal*, e a sintetase de nopalina (*t-NOS*), elemento terminador 3' do *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 1). O peptídeo CTP4 facilita a translocação do EPSP sintase nos cloroplastos, local da síntese dos aminoácidos aromáticos e ação do glifosato (CERA, 2011).

O milho GM MON810 também foi desenvolvido pela empresa Monsanto e contém um gene de endotoxina Cry1Ab de resistência a insetos (*Ostrinia nubilalis* ou ECB – *European corn borer*), originalmente do microrganismo *Bacillus thuringiensis*, incorporado por técnicas de biobalística. Esta endotoxina atua de forma seletiva através da ligação em sítios específicos do epitélio intestinal de insetos lepidópteros, não sendo reconhecidas em humanos ou outros animais. Sua construção, evidenciada por análise de *Southern blot*, possui incorporação de uma cópia truncada do gene *cry1Ab*, juntamente com o promotor CaMV (P-35S), e sequência *hsp70* (Figura 1).

Nos últimos anos as culturas híbridas com combinação de eventos múltiplos resultantes do cruzamento de plantas com mais de um gene modificado ou introduzido, ou também chamados genes piramidados, tem ultrapassado as culturas simples com apenas um evento. Essas culturas representaram em 2009 cerca de 28,7 milhões de hectares. Dos onze maiores produtores dessas culturas, oito eram países em desenvolvimento, com destaque para a Argentina, as Filipinas e a África do Sul (JAMES, 2010).

Paralelamente ao aumento do número de lavouras no país e à liberação para plantio de alguns tipos de culturas GMs, elevou-se também a preocupação quanto aos riscos ambientais e àqueles relacionados ao seu consumo, sobretudo através de entidades leigas ligadas a esses dois segmentos. As principais preocupações em torno dos OGMs recaem sobre os riscos potenciais do fluxo gênico entre espécies GMs e não-GMs, a migração e infestação de doenças e insetos para áreas não-GMs, a alergenicidade, a indução de resistência aos antibióticos, o desenvolvimento de novas plantas daninhas e a destruição da biodiversidade (KEANE e CRAWLEY, 2002; DLUGOSCH e WHITTON, 2008; KLETER et al., 2008).

De modo geral, a incidência de modificações genéticas inesperadas ou incontroladas em culturas potencialmente perigosas, independente da tecnologia utilizada para a geração da modificação genética, é extremamente baixa, e estão documentadas em poucos exemplos. As avaliações de perigo e toxicidade dos alimentos derivados de matérias-primas GM demonstram que eles são seguros e mantêm suas características nutricionais quando comparados a matérias-primas tradicionais (COCKBURN, 2002).

No entanto, os riscos ambientais e à saúde, bem como os impactos sócio-econômicos ainda resultam em diferentes posicionamentos da opinião pública e governos de vários países quanto ao plantio e comercialização dos OGMs.

1.1 Legislação acerca dos OGMs

Na União Européia, desde 2004, o limite para a não rotulagem de um produto GM é de 0,9% (EC, 2003). No Brasil o limite é de 1%, determinado pelo Decreto 4.680 de 25 de abril de 2003 (BRASIL, 2003); enquanto que em países como a Suíça, é de 0,1% em contraste com o Japão e a Rússia, que aceitam até 5% de OGM. Nos Estados Unidos, embora a legislação não exija rotulagem, o governo recomenda fazê-la voluntariamente, determinando apenas que as empresas notifiquem a FDA (Food and Drugs Administration) pelo menos 120 dias antes do novo produto ser comercializado (TOZZINI, 2004), não sendo necessária a rotulagem especial (FDA, 2001).

No Brasil, a detecção dos OGMs nos alimentos se torna necessária uma vez que o consumidor possui o direito à informação adequada sobre os produtos e serviços, assegurados pelo Código de Defesa do Consumidor (CDC) e pelo Princípio 10 da Declaração do Rio; além de não poder ser alvo de imposição legal, isto é, assegurada por lei (BRASIL, 2003).

Uma diferença importante entre as políticas de rotulagem dos países é se o regulamento implica a presença de OGMs nos produtos terminados, como no caso da Austrália, Nova Zelândia e Japão; ou considera o uso de ingredientes ou processos de modificação genética na cadeia produtiva, como no Brasil ou na União Europeia (MICHELINI et al., 2008). Alguns autores como MARCELINO et al. (2003) realizam uma interpretação da legislação brasileira considerando a ocorrência de 1% em peso para o produto final e de forma independente da composição das matérias-primas utilizadas no processo. No entanto, a ISO 21570:2005 considera que o resultado quantitativo deva ser relativo, ou seja, expresso em DNA-GM/DNA-total para cada evento.

Para se atender os limites de uso e comercialização de OGMs, bem como para o monitoramento das matérias-primas e produtos terminados prontos para o consumo, visto ao constante aumento das culturas GMs no mundo, tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas de detecção de quantificação dos OGMs em alimentos e ingredientes alimentares.

1.2 Metodologias de análise de OGMs

Os métodos de análise de OGMs em alimentos distinguem-se atualmente em detecção baseada na presença de proteína ou de ácido desoxirribonucléico (ADN ou DNA). No Brasil, a Instrução Normativa Interministerial n.01, de 1º de abril de 2004 (MAPA) determina que a verificação do limite de OGMs no produto deve ser efetuada com base na quantificação da proteína resultante da modificação genética ou do próprio DNA inserido.

No primeiro grupo distinguem-se os bioensaios e os imunoenaios, que englobam o ensaio imunoenzimático (ELISA), o imunensaio de fluxo lateral (IFL), e o Western Blot. Já os testes baseados em DNA recombinante são utilizados quando a quantificação de OGMs é necessária ou quando a amostra é oriunda de um alimento processado, pois o DNA é uma molécula mais estável que a proteína. Este segundo grupo engloba metodologias baseadas nas variações da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que incluem a PCR *screening*, a PCR *nested*, e a PCR *multiplex*. Existem outros métodos alternativos para a análise de OGMs, como a cromatografia e a espectrofotometria de massa, os microarranjos de DNA, a espectrometria no infravermelho próximo, entre outros (CONCEIÇÃO et al., 2006).

Um aspecto crucial na análise dos alimentos contendo OGMs é a quantificação, pois dependendo da sua concentração final no alimento, este será ou não rotulado como alimentos contendo produto geneticamente modificado. Para isso foram desenvolvidos métodos de quantificação como a PCR quantitativa competitiva (PCR-QC) e a PCR em tempo real (PCR-RT) (CONCEIÇÃO et al., 2004; MIRAGLIA et al., 2004; TRAPMAN e EMONS, 2005).

A PCR, que consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA, é o principal método utilizado na detecção e quantificação de alimentos contendo OGMs. É um método sensível, específico, seguro, capaz de detectar uma série de eventos (BERTHEAU et al., 2002; GOVANINI e CONCILLO, 2002) e de distinguir as variedades de GM que apresentam diferentes construções gênicas, porém expressam a mesma proteína (YAMAGUCHI et al., 2003). O gene transgênico é apenas um entre os milhares do genoma e, além disso, na prática diária, é necessário detectar uma quantidade equivalente a uma única semente geneticamente modificada entre 1.000 a 10.000 sementes convencionais. A PCR tem demonstrado ter sensibilidade suficiente para tal (CONCEIÇÃO et al., 2006), sendo a técnica mais empregada para análise e detecção da modificação genética e que menos sofre interferências dos níveis de degradação e processamento da amostra (QUERCI et al., 2010).

A PCR em tempo real é um dos métodos mais utilizados para a quantificação de OGMs nos alimentos (TAVENIERS et al., 2004; WEIGHARDT et al., 2004; CANKAR et al., 2005; CORBISIER et al., 2005; FEINBERG et al., 2005;

FERNANDEZ et al., 2005). O método permite a determinação da concentração dos produtos da amplificação durante a fase exponencial da PCR, permitindo traçar uma estimativa da quantidade inicial do DNA amplificado (AHMED, 2002).

No entanto, vários aspectos podem influenciar a detecção e quantificação dos OGMs através da técnica de PCR em tempo real, principalmente à que se deve a qualidade e quantidade de DNA presente na amostra e outros aspectos durante a produção e processamento dos alimentos em escala industrial (GRYSON et al., 2009).

1.3 Processamento dos alimentos e a degradação do DNA

A cadeia de processamento do milho e da soja envolve várias etapas que geram subprodutos destinados à indústria de alimentos. O milho possui dois tipos de processo, a moagem úmida e a seca. Da espiga inteira, o grão de milho passa por várias etapas da moagem úmida até a obtenção de amido e óleo (Figura 2): lavagem, infusão em água quente (49 – 54°C) e em dióxido de enxofre (0,1 - 0,2%) para amolecimento do pericarpo, trituração, flotação para separação do gérmen do endosperma (hidrociclonagem). O gérmen é prensado para separação do óleo, e o endosperma é moído finamente, passa por um processo de separação das frações fibrosas, e é então centrifugado para separação do glúten. O amido de milho, o primeiro subproduto da cadeia do milho é obtido da moagem e secagem da porção de amido total. Cerca de 60% deste subproduto é utilizado para produção de maltodextrina (por hidrólise), dextrose (por utilização de α -amilase) e glicose de milho (por processo combinado de alta temperatura, pressão e ácido clorídrico) e outros subprodutos.

Figura 2. Moagem úmida do milho. Adaptado de OECD (2002).

Na moagem seca, outros subprodutos são formados (Figura 3) a partir do processamento do milho, como a farinha de milho, quirera de diferentes tamanhos, e os *gritz* flocados que servirão para a produção de cereais matinais. Em alguns países, a farinha é produzida sem a remoção do óleo, sendo obtida diretamente da moagem dos grãos limpos; em outros, como comumente utilizado no Brasil, o milho passa por um processo de desgerminação, que fornece produtos de melhor qualidade.

Figura 3. Moagem seca do milho. Adaptado de OECD (2002).

Na cadeia de processamento da soja (Figura 4), vários subprodutos são obtidos, como grãos torrados, brotos de soja, farinha e outros produtos tradicionais como “missô”, leite de soja, molho de soja e o “tofu”. A proteína de soja é rica em aminoácidos, e muito utilizada em rações animais. O óleo de soja dá origem à lecitina, glicerol, ácidos graxos e esteróis, com alta utilização nas indústrias de alimentos. No entanto, a soja dá origem também a produtos não destinados à alimentação humana, principalmente os subprodutos do óleo, que possuem outras aplicações industriais.

Figura 4. Cadeia de processamento da soja. Adaptado de OECD (2002).

O processamento de alimentos, como tratamentos mecânicos, químicos e enzimáticos, associado ao excesso de calor, atividade de nucleases e baixo pH, contribuem para a degradação do DNA, afetando a sensibilidade do método, que é altamente dependente da quantidade, integridade e pureza da molécula (GRYSON, 2009). Outro problema na reação de PCR é que a DNA polimerase utilizada pode ser inibida por substâncias contidas nos alimentos, como proteínas, gorduras, polissacarídeos, polifenóis, açúcar caramelizado e outros (AHMED, 2002; GRYSON, 2009).

Os métodos quantitativos via PCR competitivo, confirmam o decaimento da recuperação das sequências de DNA alvo, no processo de fabricação (KLEIN et al., 1998; HUPFER et al., 2000). A degradação do DNA mostrou também afetar os limites de detecção e os limites de quantificação (SPIEGELHALTER et al., 2001).

O material genético da soja e do milho GMs tratados termicamente por autoclavagem e microondas, mimetizando o processamento e manufatura, tiveram uma significativa redução dos níveis de DNA detectáveis e quantificáveis (VIJAYAKUMAR et al., 2009); bem como em biscoitos e cookies preparados com diferentes concentrações de soja GM e assados a 205°C (GRYSON et al., 2007); em subprodutos da cadeia produtiva da soja RR tolerante ao herbicida glifosato (CHEN et al., 2005, 2006) e milho Bt resistente a insetos (RIZZI et al., 2003) submetidos à diferentes processos.

Algumas sequências de DNA parecem se degradar mais que outras (KAKIHARA et al., 2007). OGAWASA et al. (2004) examinaram a fragmentação de DNA de milho GM durante o processamento industrial de extrusão e verificaram que o gene endógeno que codifica a amido sintase (*SSIIb*) do milho se fragmentou mais facilmente do que um gene exógeno, embora o fato em si não possa ser generalizado para outros conjuntos de genes. Além disso, regiões com maior frequência de oligonucleotídeos G e C são normalmente mais estáveis quando expostas a altas temperaturas (YOSHIMURA et al., 2005).

Métodos qualitativos demonstraram que sequências de DNA mais longas (>300 bp) são mais suscetíveis à degradação, gerando resultados falso-negativos. Devido à maior estabilidade de sequências pequenas de DNA sob condições de estresse, é preferível que se utilize sequências <200bp para análises qualitativas e quantitativas de amostras processadas, pois se assume que tanto o gene recombinante quanto o gene de referência possuem o mesmo tamanho, e serão degradados igualmente durante o processamento (WISEMAN, 2002).

O desenvolvimento e a validação dos métodos de quantificação são geralmente acompanhados pela análise de materiais de referência originários do Institute of Reference Materials and Measurements (IRMM), Bélgica, que representam misturas de farinhas contendo diferentes proporções de materiais GMs, seguidos pela análise comparativa dos alimentos processados. Segundo RODRÍGUEZ-LÁZARO (2006), o limite para rotulagem corresponde à razão massa-GM/massa-total, mas a maioria dos métodos atuais para detecção de OGMs mede a razão DNA-GM/DNA-total, que é convertido então para a razão em massa através da utilização dos materiais de referência.

Enquanto que as medidas baseadas na razão de DNA-GM/DNA-total podem ser determinadas com acurácia, pela alta sensibilidade e especificidade dos métodos de análise existentes, a conversão para a razão em massa nem sempre é verdadeira. Os problemas de conversão surgem da relação não evidenciada do conteúdo de DNA e a massa da planta (HOLST-JENSEN et al., 2003). Além disso, a presença simultânea de diferentes eventos de transformação na mesma amostra torna essa conversão ainda mais difícil (MICHELINI et al., 2008). Experimentos demonstrando a composição do produto terminado e a influência do processamento na quantificação relativa foram pouco estudados até o momento (MIRAGLIA et al., 2004; ENGEL et al., 2006).

Um estudo feito por MOREANO et al. (2005), demonstrou que o resultado quantitativo de uma amostra com 1% de GMs e 99% não-GMs de ingredientes com partículas de diferentes tamanhos, apresenta uma porcentagem que não reflete a real proporção em peso da amostra, sendo o resultado sub ou sobre-estimado. Este estudo mostrou que a quantificação relativa de OGM pode estar distorcida de maneira significativa, se o alimento possuir uma distribuição de partículas de diferentes tamanhos. Especialmente, se a presença de OGM estiver limitada a apenas uma das frações, as proporções de DNA extraídas das porções podem não refletir as proporções reais em peso de material GM contido na amostra.

Ainda não está claro se as discrepâncias na quantificação resultam da degradação de DNA ou se é inerente ao processo de análise. Resultados de um estudo interlaboratorial para a validação da quantificação do milho Bt176 permitiu uma acurada quantificação da quantidade de OGM nos materiais de referência, porém mostrou uma sub-estimativa da proporção de OGM nessas amostras após esterilização (BROLL, 2002; ISO/DIS, 2003).

Por outro lado, a análise de farinha de soja submetida a quatro diferentes tratamentos, microondas, aquecimento por condução, ultrassom, e à pressão por autoclavagem, demonstrou que a degradação física de DNA não afeta a quantificação relativa do conteúdo de OGM, considerando que tanto as sequências de DNA exógenas quanto as sequências de DNA endógenas possuam tamanhos similares (DEBODE et al., 2007).

É necessário ressaltar a importância da padronização de um protocolo internacional para a análise quantitativa de OGM em alimentos, com protocolos de validação que não se restrinjam somente a materiais de referência sem processamento, pois os resultados dessas análises podem não representar a mesma performance nas análises de amostras compostas ou processadas. Além disso, procedimentos para a validação de métodos quantitativos para o monitoramento de produtos durante sua cadeia produtiva precisam incluir experimentos que demonstrem a influência tanto da composição e do processamento na alteração dos resultados de quantificação relativa. Futuros protocolos para a determinação da quantidade de OGM em produtos processados precisam se basear em sequências recombinantes e de referência específicas para cada táxon, e que sejam de igual tamanho. De outro modo, os métodos de análise estarão claramente limitados à determinação de amostras sem processamento (ENGEL et al., 2006).

1.4 Amostragem

O problema na correta determinação da porcentagem de material GM nos produtos finais se deve não apenas à degradação do material genético durante o seu processamento, mas também à determinação do conteúdo de OGM em matérias-primas, que está sujeita a erros durante as várias etapas de amostragem, sub-amostragem e análise. Na maioria dos casos, OGMs estão distribuídos de forma heterogênea (PAOLETTI et al., 2006). Quanto menor a concentração de OGM, mais relevante é o efeito de diferentes estratégias de amostragem. A experiência com as metodologias de amostragem para micotoxinas serve como modelo para OGMs na maioria dos países da Europa (MIRAGLIA et al., 2004), porém planos de amostragem específicos e universais para OGMs foram pouco desenvolvidos e testados. Na legislação brasileira não há um protocolo de amostragem oficial, de forma que as indústrias e produtores de grãos realizam de forma aleatória o processo de coleta de amostras para monitoramento de OGMs.

Atualmente na Europa, para planos de amostragem para OGMs as principais referências são a *Commission Recommendation 2004/787/EC*, e a prCEN/TS 15568:2006 em conjunto com a ISO 6644:2002 e ISO 13690:1999, ambas revisadas pela ISO 24333:2009.

Os dois documentos sugerem uma amostragem para matérias-primas em grãos sem processamento e consideram que em geral, os OGMs nos lotes de matérias-primas estão, se presentes, distribuídos de forma randômica ou aleatória. Desta forma, a média, o desvio padrão, e o risco assumido pelo produtor e consumidor podem ser estimados segundo uma distribuição Binomial ou de Poisson. Uma adaptação para as propriedades matemáticas de Poisson foi feito para situações não randômicas (HÜBNER, 2001). Foi demonstrado também que desvios pequenos de uma distribuição randômica podem afetar fortemente a acurácia (% contaminação) e a precisão (% variância da contaminação) da estimativa de contaminação por OGMs (PAOLETTI et al., 2003). Como consequência, no caso de distribuições heterogêneas, a probabilidade das amostras não serem representativas do lote é muito grande (QUERCI et al., 2007).

De fato, o KeLDA Project – *Kernel lot distribution assessment* (PAOLETTI et al., 2006) conduzido na União Européia para o estudo de amostragem para OGMs em *commodities* de grãos de soja verificou que a distribuição de material GM possui grandes desvios significativos. Neste estudo, ficou demonstrado que a distribuição de OGMs é heterogênea, enfatizando a necessidade de se desenvolver protocolos de amostragem estatísticos não baseados em modelos de distribuição.

O projeto seguinte, KeSTE – *Kernel Sampling Technique Evaluation*, foi desenvolvido nesta abordagem e sugere um cálculo para estimativa de erro para amostragem para OGMs (PAOLETTI et al., 2003) e sua aplicabilidade está descrita na *Commission Recommendation 2004/787/EC*. Esse modelo é inovador, pois além de não considerar um modelo prévio de distribuição, apresenta a possibilidade de se estimar o erro de amostragem de diferentes protocolos considerando diferentes propriedades das amostras.

Segundo as recomendações, se o resultado da análise estiver dentro do intervalo de erro aceitável ($\pm 50\%$ do *threshold*, no caso do Brasil, de 1%), a análise individual de cada amostra elementar necessita ser feita para avaliar o intervalo de

confiança em torno da estimativa. O resultado analítico das amostras individuais é utilizado para estimar a incerteza do conteúdo de OGM expresso em desvio padrão.

Para a amostragem de matérias-primas a CEN/TS e a 2004/787/EC sugerem uma coleta de 10kg de amostra para lotes de até 50ton, sendo 5kg armazenados como amostra de referência, e 5kg utilizados para formar uma amostra global, de onde será retirada a amostra laboratorial. Para produtos terminados embalados uma amostragem de $\sqrt{n} + 1$, sendo n o número de embalagens produzidas, deve ser amostrada segundo estas referências.

Outra questão relevante é o processamento e o tipo de matriz testada. Matérias-primas pouco processadas e pouco particuladas como grãos ou farinhas em geral, podem possuir uma maior heterogeneidade, enquanto materiais muito processados ou líquidos podem ser mais homogêneos. Produtos terminados, embalados, podem se classificar melhor nesta última categoria.

A definição de um plano de amostragem para OGMs nas indústrias é um processo moroso. É preciso ponderar a decisão entre a alocação de recursos (custos de amostragem e das análises) e o risco associado com decisões baseadas em resultados analíticos incorretos. Assim, justifica-se a avaliação de planos de amostragem aplicáveis à cadeia de produção de alimentos industrializados.

No Brasil, poucos alimentos são rotulados, pois as empresas alegam que estão abaixo da concentração de 1% de OGMs na sua composição. Entretanto, certamente muitos deles possuem ingredientes derivados de subprodutos GMs, não mencionados no rótulo. Atualmente, o controle principal das grandes indústrias de alimentos é feito durante o fornecimento da matéria-prima, derivada de soja ou milho, através de laudos emitidos pelos próprios fabricantes, garantindo-se que a legislação seja cumprida antes do processo de fabricação do produto terminado. Futuramente, será necessário não apenas o controle pré-processamento, mas também do produto final, já que o fornecimento de matérias-primas ficará comprometido com o aumento do plantio de OGMs no país. Além disso, o conteúdo GM dos produtos terminados é o principal alvo das agências regulatórias (KAY e PAOLETTI, 2001).

1.5 Produção e contaminação adventícia de grãos

A determinação do plano de amostragem se torna importante também na avaliação da contaminação entre as culturas de milho e soja brutas e matérias-primas derivadas, e deve ser levada em consideração por indústrias fornecedoras dessas matérias-primas. Atualmente grande parte das indústrias fabricantes de alimentos para consumo humano e animal exige a apresentação de laudos analíticos que atestam a ausência de OGMs (PCR negativo ou resultado numérico em porcentagem) para RRS, no caso de matérias-primas derivadas de soja, ou para milho MON810, no caso de matérias-primas derivadas de milho. A análise de OGMs por laboratórios comerciais incluem análises de *screening* por PCR em tempo real, identificação de OGMs ou quantificação específica de eventos.

No entanto, sabe-se que o risco de contaminação entre as culturas é alto, de forma que a contaminação de soja GM pode ocorrer em matérias-primas de milho, e vice-versa, bem como em outras culturas. A presença adventícia de sementes é a presença não intencional, num lote ou embalagem, de baixos níveis de sementes que não sejam da variedade ou híbrido que está sendo comercializado (LAFFONT, 2005; PESKE, 2009; VANDERGRIFT e GOULD, 2003). Este é um fato corrente em sementes selecionadas para plantio mesmo antes da introdução de culturas GM.

Vários autores destacam a presença adventícia de sementes GM em sementes convencionais e a co-existência entre essas culturas (ANDRADE et al., 2009); no entanto, além da presença adventícia entre culturas convencionais e entre culturas convencionais e GM de mesma espécie, há também a ocorrência entre culturas convencionais e GM de espécies distintas, o que foi até então pouco estudado. A porcentagem de ocorrência de sementes GM de forma não intencional aumenta proporcionalmente ao crescimento das áreas de culturas-GM plantadas ao redor do mundo (LEASK, 2000).

Para *commodities*, por exemplo, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) permite até 2% de grãos de milhos quebrados ou com material estranho e a Associação das Agências Oficiais de Certificação de Sementes (AOSCA) determinou uma tolerância de até 0,5% de outras variedades de sementes

e 2% de presença de material inerte em milho híbrido certificado. A associação considera como milho “puro” mesmo com uma presença média de 98% de milho (KERSHEN, 2006).

Além do cruzamento natural que pode ocorrer entre culturas através da dispersão de pólen e fluxo gênico entre plantas e presença de ervas daninha no campo, a presença adventícia pode ocorrer durante a cadeia produtiva e processamento dos grãos, transporte, ou carregamento por máquinas, equipamentos e veículos (KERSHEN, 2006); ou seja, pode ser de origem biológica ou mecânica (VANDERGRIFF e GOULD, 2003).

Existe também a certificação de matérias-primas livre de transgênicos (*OGM-free*) para países importadores. O Brasil exporta soja não-GM e produtos de soja processada para a Áustria, Alemanha, França, Itália, Grã-Bretanha e Japão. Atualmente, existem dois programas conduzidos pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o Programa de Fiscalização de Atividades com Organismos Geneticamente Modificados (Fiscorgen) e o Protocolo de Cartagena, que é um tratado firmado no âmbito da Convenção de Diversidade Biológica (CDB) e visa principalmente contribuir para garantia da conservação e utilização sustentável da diversidade biológica levando em consideração os movimentos transfronteiriços (MAPA, 2010). Para a garantia da certificação, produtores e indústrias precisam ter aprovados vários documentos de rastreabilidade emitidos pelo MAPA, por câmaras de comércio e pelos transportadores, como o *Bill of Lading* (conhecimento de embarque), Certificado de Não-OGM para produtores, informações dos armazéns de origem e terminais de exportação, certificado de inspeção de limpeza de terminais e porões, testes de sementes, entre outros.

O aumento do plantio e comercialização de OGMs no Brasil demanda um esclarecimento sobre vários fatores que possam influenciar a detecção e quantificação de material-GM nos alimentos, de forma a permitir a conformidade dos produtos de acordo com a legislação em vigor.

2 OBJETIVO GERAL

A proposta do presente trabalho é a avaliação do impacto dos processos de produção e da amostragem em análises qualitativas e quantitativas de alimentos visando o monitoramento de insumos oriundos de organismos geneticamente modificados.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Observar a alteração da quantidade e pureza da molécula de DNA em amostras de alimentos submetidos a diferentes processos de fabricação, em escala industrial.
- 2) Comparar resultados qualitativos de detecção através da técnica de PCR em tempo real, em amostras de alimentos com diferentes graus de processamento, para avaliação a eficiência da técnica para análise de OGMs.
- 3) Comparar resultados qualitativos através da técnica de PCR em tempo real, em amostras de alimentos com diferentes tipos de processamento para avaliação da presença adventícia de culturas não-GMs e GMs e as conseqüências para fins de rotulagem e legislação de OGMs.
- 4) Comparar resultados quantitativos de produtos terminados derivados de soja ou milho, analisados por PCR em tempo real, a fim de se avaliar a aplicabilidade do plano de amostragem adotado como modelo para o monitoramento de OGMs em ambiente industrial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Seleção das amostras

No Brasil, as variedades GM autorizadas para plantio e comercialização são representadas por soja, milho e algodão, sendo as duas primeiras, culturas de interesse para a indústria de alimentos. Desta forma, as amostras foram selecionadas (Apêndice A) para o presente estudo segundo os seguintes requisitos:

- a) matérias-primas compostas por soja ou milho e/ou derivados de soja ou milho;
- b) matérias-primas com potencial risco de presença adventícia durante fabricação, transporte ou armazenamento como farinhas em geral;
- c) produtos terminados empacotados, prontos para consumo, compostos por soja ou milho e/ou derivados de soja ou milho em quantidades relevantes;
- d) produtos terminados empacotados, prontos para consumo, compostos por matérias-primas com potencial risco de presença adventícia, em quantidades relevantes.

Além disso, foi selecionado um tipo de produto terminado derivado de soja como modelo para se avaliar a distribuição do conteúdo de OGMs e definição de planos de amostragem.

3.2 Métodos

3.2.1 Definição do plano de amostragem

Baseado nas referências *Comission Recommendation 2004/787/EC* e prCEN/TS 15568:2006, foi determinado um plano de amostragem para matérias-primas e produtos terminados para este estudo.

A coleta de amostras para análise laboratorial pode ser de dois tipos: estática ou sistemática. Na coleta estática, amostras são recolhidas de diversas porções do lote; enquanto na sistemática, a atividade é realizada em determinados intervalos de tempo. Para a coleta de matérias-primas, a amostragem para lotes menores que 50 toneladas foi estática, coletada na abertura de cada *bag* ou contêiner (Figura 5).

Para os produtos terminados, a CEN/TS 15568 e a EC 2004/787 menciona uma coleta de amostras de $\sqrt{n} + 1$, sendo n o número de embalagens produzidas. Porém, devido aos custos implicados na coleta, transporte e descarte de material e recursos humanos alocados para a coleta das amostras, alternativamente foi proposto um plano de amostragem segundo a ISO 2859 para produtos embalados. A amostragem para produtos terminados foi sistemática, ou seja, feita periodicamente. Do lote produzido, 8 unidades foram retiradas da linha no início, 6 no meio, e 6 no final da produção de somente um lote. Do total de 20 amostras, 10 foram armazenadas como referência, enquanto que 10 foram utilizadas para compor a amostra global, de modo semelhante à coleta de matérias-primas (Figura 5).

Figura 5. Esquema de amostragem de matérias-primas segundo plano CEN/TS 15568. Amostras de 1000g foram coletadas de dez *bags* ou contêineres de mesmo lote e divididas em duplicatas de amostra de referência (A) e amostra elementar (B). As dez amostras elementares foram reunidas para formar uma amostra global de 5000g e homogeneizadas vigorosamente (C). Da amostra global uma amostra laboratorial de 500g foi separada e enviada para análise (D). No laboratório, uma duplicata de 100mg cada amostra laboratorial foi pesada após homogeneização (E). Para amostras de produto terminado ou amostras com alto grau de processamento (ex. amido de milho), a amostra laboratorial foi composta por cerca de 2g.

Segundo a CEN/TS 15568, amostras com conteúdo GM com um coeficiente de variação (CV) de $\pm 0,5\%$ do *threshold* devem ter suas replicatas quantificadas individualmente. Desta forma, foram testadas replicatas individuais (Figura 5 – A ou B) para os resultados de amostras cuja amostra analítica (Figura 5 – E) apresentou um resultado de quantificação próximo ao limiar de 1% imposto pela legislação para não-rotulagem. Os resultados individuais foram comparados com o resultado da amostra analítica, sub-amostrada da amostra global (Figura 5 – C).

3.2.2 Preparação das amostras

Após vigorosa homogeneização da amostra de 500g, foram pesadas cerca de 100mg de amostra de matérias-primas e cerca de 2g de amostra de produtos terminados e altamente processados, como amido de milho e lecitina de soja; todos em duplicata.

Todos os utensílios, bem como bancadas e equipamentos utilizados, foram higienizados antes e após a utilização com solução de hipoclorito de sódio a 13% (Sigma-Aldrich), água deionizada e solução de álcool 70% para evitar a contaminação cruzada por DNA.

3.2.3 Extração de DNA

O método de extração CTAB adotado se baseia na EN ISO 21571:2005 e no manual do fabricante (Qiagen). Às amostras previamente pesadas foram adicionados solução tampão CTAB e protease, e posteriormente incubadas num termomixer (mod. Comfort, Eppendorf) ou em banho-maria (Fanem) a $65\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 60 min. O material foi centrifugado a 15000g por 10min. O sobrenadante foi misturado a clorofórmio, e novamente centrifugado, e em seguida misturado a tampão salino PB (Qiagen). Após homogeneização, a solução foi filtrada em uma coluna QIAquick (Qiagen), acoplada à bomba de vácuo. A coluna foi lavada com tampão PE (Qiagen) e seca por centrifugação à 12000g por 5min. Para eluir o DNA purificado, foi adicionado tampão EB (Qiagen), e centrifugado novamente. Para amostras que contém amido, foi adicionada uma solução de α -amilase a 0,01% (Sigma-Aldrich) juntamente com o tampão CTAB em quantidade suficiente para dissolução da amostra. Uma vez líquida, os mesmos passos de extração descritos anteriormente foram seguidos.

O DNA de todas as amostras foi extraído em duplicata. Uma amostra em branco, contendo apenas reagentes, foi de extraída e amplificada da mesma forma e

juntamente com as amostras, a fim de se certificar a ausência de contaminação cruzada durante as análises.

3.2.4 Verificação da quantidade e pureza do DNA

A concentração de DNA e a pureza do DNA extraído foi determinado através de espectrofotômetro (modelo Gene Quant 1300, GE), pela leitura da absorbância a 260 nm A_{260} e à 280 nm A_{280} de luz ultravioleta (UV) em capilares de quartzo. Este método considera a medição das impurezas e do ruído a 230 nm e 320 nm para o cálculo da concentração.

Para cada amostra foi considerada a média entre três leituras do mesmo capilar, e o resultado expresso em ng/ μ L.

A pureza do DNA foi avaliada pela razão entre as absorbâncias entre 260 nm e 280 nm, uma vez que ácidos nucleicos absorvem a luz majoritariamente em 260 nm e proteínas a 280 nm. A razão entre as leituras $A_{260/280}$ deve estar entre 1,7 e 2,0 para o DNA ser considerado como “puro”. Um valor menor que 1,7 pode ser indicativo da contaminação do extrato de DNA com proteínas, fenóis ou surfactantes, enquanto que um valor acima de 2,0 pode indicar presença de RNA (TEARE et al., 1997).

3.2.5 Seleção das sequências-alvo

De acordo com o nível de especificidade requerida na reação de PCR para detecção de OGMs, as sequências-alvo podem ser específicas para detecção do gene, da construção de modificação genética, ou do transgene específico do evento (HOLST-JENSEN et al., 2003). No presente estudo optou-se pela amplificação do gene, para detecção da presença de soja, milho, trigo ou arroz; pela amplificação da construção de modificação genética juntamente com a construção do transgene específico, para detecção dos eventos RRS e MON810; e somente pela

amplificação do transgene específico do evento nas reações de quantificação de OGMs, após reação de detecção na etapa anterior.

Para a detecção das culturas presentes nas amostras foram escolhidos genes endógenos do tipo *housekeeping*: lectina, zeína, prolaminae WpepCi1. O gene de lectina codifica para uma proteína de armazenamento no grão da soja e com cerca de 5% do total de massa proteica do grão (VODKIN et al., 1983). A zeína também é uma proteína de armazenamento no endosperma do grão de milho (LANDRIDGE e FEIX, 1983). O gene WpepCi1 corresponde à sequência que codifica para o íntron 1 da fosfoenolpiruvato carboxilase no trigo. Por último, a prolamina é uma proteína do endosperma do arroz (Bechtel e Juliano, 1980) e permite a detecção de DNA endógeno do arroz.

Para a detecção evento específica foram escolhidas sequências presentes na construção de modificação genética: fragmentos P-35S, t-NOS, CTP4 e CP4EPSPS para detecção de soja RRS; e os fragmentos P-35S e hsp-cry1Ab para detecção de milho MON810.

As sequências-alvo foram amplificadas por nove *primers* e sondas (Tabela 1). Os conjuntos de *primers* e sondas foram desenhados através da ferramenta *Primer Express* (Applied Biosystems). Os *primers* foram fornecidos liofilizados e com grau HPSF (*highly purified salt free*) (Eurofins MWG Operon).

Tabela 1. Sequências de 9 conjuntos de *primers* e sondas para nove alvos diferentes.

Gene	Primer ou Sonda	Sequência	Tamanho de amplicon (bp)	Posição	Referência
Lectina	Le1-for	5'-AACCGGTAGCGTTGCCAG-3'	81	1253-1270	Vaitilingom et al., 1999
	Le1-rev	5'-AGCCCATCTGCAAGCCTTT-3'		1315-1333	
	Le1-p	5'-(VIC)CTTCCTTCAACTTCACC(NFQ)-3'		1279-1295	
Zeína	Zein-for	5'-GGGCTTGCCAGCTTGATG-3'	60	166-183	Hernández et al., 2004 Shrestha et al., 2008
	Zein-rev	5'-CGGTAAGGCCAACAGTTGCT-3'		225-244	
	Zein-p	5'-(VIC)CGTGTCCGTCCCTG(NFQ)-3'		185-198	
Prolamina	Pro-for	5'-CGTGTCCGTCCCTG-3'	59	863-876	Este estudo
	Pro-rev	5'-GCGGCAAGCCCCTTCTT-3'		921-937	
	Pro-p	5'-(VIC)TGCCAGACTTGTTGTTTCTCA(NFQ)-3'		884-905	
WpepCi1	Wpep-for	5'-GTCCATTGCTTGTAAGACCGTTA-3'	121	1287-1311	Este estudo
	Wpep-rev	5'-TCAAGGCAAGTCGATTCAAGA-3'		1407-1428	
	Wpep-p	5'-(VIC)CCTTACCTAACAAAGCCT(NFQ)-3'		1325-1342	
p-35S	p-35S-for	5'-GACAGTGGTCCCAAAGATGGA-3'	80	1273-1293	Gamboa et al, 2006
	p-35S-rev	5'-TGCTTTGAAGACGTGGTTGGAA-3'		1352-1373	
	p-35S-p	5'-(FAM)CCCACGAGGAGCATC(NFQ)-3'		1300-1315	
t-NOS	tNOS-for	5'-CCC GCAATTATACATTTAATACGCGATAG-3'	76	1727-1756	Este estudo
	tNOS-rev	5'-CACCGCGCGCGATAATTTAT-3'		1802-1822	
	tNOS-p	5'-(FAM)TTTGCGCGCTATATTT(NFQ)-3'		1777-1793	
CP4EPSPS	CP4-for	5'-CCGGCGACAAGTCGATCTC-3'	72	234-253	Este estudo
	CP4-rev	5'-CGGTGATGCGCGTTTCA-3'		305-322	
	CP4-p	5'-(FAM)CCACCGGTCCTTCATG(NFQ)-3'		253-269	
CTP4	CTP4-for	5'-GAAGATCGAACTCTCCGATACGA-3'	85	58-81	Este estudo
	CTP4-rev	5'-TGTTTGAACGATCGGGAATTG-3'		142-164	
	CTP4-p	5'-(FAM)TGATGAGCTCGAATTC(NFQ)-3'		89-105	
hsp-cry1Ab	hsp-for	5'-ACCAAGCGGCCATGGA-3'	57	51-67	Este estudo
	hsp-rev	5'-GGCAGTTGTACGGGATGCA-3'		107-127	
	hsp-p	5'-(FAM)AACAACCCAAACATCA(NFQ)-3'		68-84	

As sondas TaqMan MGB (Applied Biosystems) utilizadas apresentam uma construção que lhe conferem algumas características. A molécula MGB (*Minor Grooving Binding*) ligada na extremidade 3' da sonda aumenta a temperatura de melting (T_m) sem aumentar o tamanho da sonda, o que permite o desenho de sondas menores. A extremidade 3' possui também um *quencher* não fluorescente (NFQ). As sondas dos genes endógenos foram marcadas com um corante repórter fluorescente (VIC), enquanto que as sondas dos genes exógenos foram marcadas o corante repórter 6-carboxifluoresceína (FAM), ambas na terminação 5'.

Quando a sonda MGB se hibridiza com a sequência complementar de DNA, a fluorescência é inibida pelo *quencher* NFQ. Durante a fase de extensão do PCR a atividade de exonuclease 5'-3' da Taq-polimerase cliva a sonda de hibridização, e o sinal emitido pelo corante repórter não é mais transferido para o *quencher*, resultando no aumento da emissão de fluorescência a 518nm (FAM) ou a 554nm (VIC) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2011).

Embora as reações de PCR em tempo real com a plataforma TaqMan sejam de alta especificidade, os *primers* e sondas foram testados a fim de se verificar amplificações não-específicas através da utilização de materiais de referência certificados provenientes da IRMM ou preparados através de amostras de referência preparadas no próprio laboratório (*in-house*), a saber:

- Material de referência *in-house* contendo 100% *Oryza* spp. em grãos triturados
- Material de referência *in-house* contendo 100% *Triticum* spp. em grãos triturados
- Material de referência *in-house* contendo 100% *Zea mays* em farinha
- IRMM ERM BF410ak contendo <0.03% soja RRS
- IRMM ERM BF410bk contendo 0.1% soja RRS
- IRMM ERM BF413B contendo 0.1% milho MON81

Para a soja, amostras contendo 0% RRS estão em escassez, portanto, para a análise foram utilizadas amostras com o menor teor de soja-GM disponível.

O DNA de todos estes materiais foi extraído conforme 3.2.2 a 3.2.4, e testado para reação de amplificação por PCR segundo descrito adiante.

3.2.6 Pré-amplificação do DNA por PCR

Devido ao processamento das amostras de alimentos, pode-se encontrar o DNA degradado e fragmentado em diferentes graus. A reação de PCR é altamente dependente da especificidade e sensibilidade do protocolo de amplificação, mas também da qualidade e quantidade do DNA disponível. Como demonstrado por Del

GAUDIO (2010), uma etapa de pré-amplificação do DNA extraído de alimentos processados pode levar ao aumento do valor C_T quando em comparação com uma análise de PCR sem esta etapa.

No protocolo descrito, um mix de *primers* e sondas para as regiões endógenas e exógenas foi preparado para a análise de PCR. No presente estudo, todos os 9 grupos de *primers* e sondas, foram diluídos a 9,0nM e 2,5nM com água deionizada, respectivamente. Foram adicionados 250ng do DNA de cada amostra e 25μL de Taq Gold Polimerase (TaqMan PreAmp Master Mix, Applied Biosystems) para um volume de reação final de 50μL. A pré-amplificação foi feita em um termociclador (mod. Veriti, Applied Biosystems) com um ciclo de desnaturação de 10min a 95°C, seguido por 14 ciclos de 4min/63°C e 15s/95°C. As amostras foram resfriadas à -20°C imediatamente após o término dos ciclos.

Todas as etapas de preparação dos reagentes foram realizadas sob fluxo laminar com prévia utilização de luz ultravioleta para descontaminação das superfícies de trabalho.

3.2.7 Análise qualitativa por PCR em tempo real

O DNA pré-amplificado de cada amostra foi analisado em duplicata pela técnica de PCR em tempo real (mod. 7900HT, Applied Biosystems), que permite o monitoramento da emissão de fluorescência durante a amplificação das cadeias de DNA. Tanto o PCR quanto a detecção da fluorescência foram realizados no mesmo equipamento.

Após a etapa de pré-amplificação, 10μL foram pipetados em cada poço de uma placa de 384 poços, contendo 2,5μL das amostras pré-amplificadas, 5,0μL da enzima 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), e 2,5μL do mix de *primers* e sondas na concentração 900nM e 250nM, respectivamente. A amplificação foi realizada no PCR em tempo real (mod. 7900HT, Applied Biosystems), com um ciclo inicial de 10min/95°C para ativação da Taq polimerase e 40 ciclos a 15s/95°C e 60s/60°C, conforme recomendações do fabricante.

Após finalização dos ciclos, um *threshold* de 0,1 foi estabelecido e os valores C_T foram gerados através do software SDS (Applied Biosystems). Estes valores correspondem ao número de ciclos necessários para a detecção da amplificação ao nível do *threshold* e é inversamente proporcional ao número de cópias da sequência alvo presente na amostra. Amostras exibindo um valor C_T acima de 30 para ambas as amostras foram consideradas como “não detectadas” para os alvos de amplificação. Estudos anteriores demonstraram que este valor corresponde ao limite de detecção (LOD) do método.

3.2.8 Análise quantitativa por PCR em tempo real

A análise quantitativa de OGMs foi baseada na metodologia descrita pela EN ISO 21570:2005. Dois materiais de referência constituídos por farinhas de soja, todos fornecidos pela IRMM (Bélgica) foram utilizados neste experimento: soja RRS (ERM BF410D) na concentração de 10,0 g/kg e soja RRS (ERM BF410C) na concentração de 5,0 g/kg.

O método de quantificação de OGMs por PCR em tempo real é realizado num equipamento que ao mesmo tempo detecta as fluorescências dos corantes repórteres (VIC ou FAM) e realiza os ciclos de tempo e temperatura da reação de PCR *multiplex*. Neste tipo de PCR, ambos os genes endógenos e exógenos são amplificados numa mesma reação por dois conjuntos específicos, cada um contendo um par de *primers* e uma sonda, não existindo interferência entre ambas as reações.

O DNA dos materiais de referência foi extraído conforme protocolo descrito em 3.2.3 e a leitura de concentração em ng/ μ L conforme 3.2.4.

Uma quantidade de 200ng de DNA das amostras foi pipetado em duplicata em 45 μ L de reagente, constituído por 25 μ L da enzima TaqMan Universal Polimerase (Applied Biosystems), 15 μ L de água e 5 μ L do mix de *primers* e sondas. Este mix contém os *primers* para os genes exógenos RRS em concentração de 300nM, de 30nM para o gene endógeno lectina, e de 100nM para as sondas.

Uma curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas de 200ng do material genético GM na concentração de 1% extraído dos materiais de referência certificados para cada evento. As diluições continham 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001% e 0,0005% do material GM de referência, todas em triplicata.

Os DNAs das amostras e dos materiais de referência em variadas concentrações e os reagentes foram pipetados numa placa de 96 poços (Applied Biosystems). Os conteúdos da placa foram amplificados por PCR em tempo real (mod. 7900HT, Applied Biosystems) numa condição termal de 2min/50°C, 10min/95°C, e 45 ciclos de 20s/95°C e 40s/55°C. Após a finalização da corrida, foi estabelecido um *threshold* de 0.02 para análise dos dados brutos.

Com os resultado das leituras da curva padrão foi construído um gráfico do valor C_T versus a concentração em *log*. O conteúdo de milho ou soja GM das amostras (X), em percentagem, considera os valores dados pela leitura da amplificação no equipamento, e é dado pela seguinte fórmula (1),

$$\begin{aligned} \log (X) &= (Y - b) / a \\ Y &= a.\log (X) + b \end{aligned} \quad (1)$$

sendo: X = percentagem relativa de conteúdo GM
a = inclinação da curva padrão
b = intersecção da curva padrão
Y = valor C_T da amostra.

3.2.9 Avaliação dos resultados

3.2.9.1 Degradação do DNA decorrente do processamento dos alimentos

A pureza e o rendimento do DNA das amostras foram comparados com o processamento no qual a amostra foi submetida. Esperava-se que amostras menos processadas apresentassem maior rendimento de DNA após extração. Foi verificada

também a possibilidade de se analisar uma amostra de alimento, dependendo do grau de processamento, com relação à detecção de OGMs através da técnica de PCR em tempo real.

3.2.9.2 Presença adventícia entre culturas não-GM e GM

Uma vez verificada a especificidade dos *primers* e sondas utilizados, as amostras foram amplificadas por PCR em tempo real visando a detecção de culturas através dos genes endógenos (soja, milho, arroz e trigo) e a detecção dos eventos RRS e MON810. Uma comparação em porcentagem foi calculada, considerando-se a ocorrência matriz principal da amostra (soja, milho, arroz e trigo) e outras matrizes não-GM e GM.

3.2.9.3 Amostragem

Para a avaliação de performance das reações de PCR foram utilizados os parâmetros de inclinação da reta (*slope*) e linearidade. A máxima eficiência da reação de PCR é alcançada quando o valor de inclinação da reta é de -3.3 e a linearidade está acima de 0.98. No entanto, valores entre -3.1 e -3.9 indicam uma boa eficiência da reação.

A análise dos dados dos valores C_T s das amostras elementares foi realizada com ferramentas de estatística aplicando-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk, com o auxílio do software R (Vienna, Austria), e o teste T-Student para reconhecer a significância entre duas medidas amostrais independentes através do teste t bicaudal para uma só amostra (*one sample t-test*) a um nível de significância de $\alpha=5\%$ e n-1 graus de liberdade (2):

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad (2)$$

sendo: t = valor t de Student,

$\bar{x}$ = média dos valores C_T das replicatas,

μ_0 = diferença da média dos valores C_T das replicatas e o valor C_T da amostra global,

s = desvio padrão dos valores C_T das replicatas e,

n = número de replicatas.

Duas hipóteses H_0 (3) e H_1 (4) foram formuladas para verificar se o resultado de quantificação relativa após a homogeneização e formação da amostra global foi representativa das 10 amostras elementares, sendo:

H_0 : *A amostra global de 5 Kg formado pelas amostras elementares e reduzida para uma amostra laboratorial de 0,0001Kg é representativo das 10 amostras elementares (sem diferença significativa entre a amostra global e as 10 amostras elementares).* (3)

H_1 : *A amostra global de 5 Kg formado pelas amostras elementares e reduzida para uma amostra laboratorial de 0,0001Kg não é representativo das 10 amostras elementares (há diferença significativa entre a amostra global e as 10 amostras elementares).* (4)

A avaliação do plano de amostragem discutirá a adoção da EC 2044/787, da CEN/TS15568:2006 e ISO 2859:1985 como modelo no processo fabril e no processo decisório das políticas de segurança dos alimentos.

4 RESULTADOS

4.1 Plano de amostragem e coleta de amostras

O plano de amostragem indicado pelas diretivas EC (2003) e CEN/TS (2006) foi aplicado para a coleta de amostras de matérias-primas, bem como o plano de amostragem proposto para produtos terminados. Uma quantidade de 168 amostras foi coletada em sete plantas industriais de processamento de alimentos de diversas categorias e também em mercados localizados na cidade de São Paulo, durante o período de novembro de 2010 a março de 2011.

Um aspecto negativo para a adoção do plano de amostragem é que para as 168 amostras analisadas envolveu um descarte do excedente decorrente das etapas de coleta, fracionamento e homogeneização, como observado na Tabela 2. O total de excedente de amostras foi de aproximadamente duas toneladas e não pôde ser novamente aproveitado nas linhas de produção, caracterizando um desperdício intrínseco ao processo de amostragem.

Tabela 2. Cálculo de excedente de coleta das 168 amostras de matérias-primas e produtos terminados após aplicação do plano de amostragem proposto.

	Amostras coletadas (Kg)	Amostra analisada em duplicata (g)	Excedente de amostras de referência (Kg)	Excedente de amostras utilizadas na amostra global (g)	Total de amostra excedente (g)	Total para as amostras analisadas (Kg)
Matérias-primas (108)	10,0	0,1	5,0	4999,8	9999,8	1080,0
Produtos terminados (60)	16,0	0,1	8,0	7999,9	15999,9	960,0

¹ Para o cálculo das amostras coletadas de produtos terminados foi considerada uma média de 800g para cada replicata.

4.2 Extração e determinação da concentração de DNA

Após a extração em duplicada de cada amostra, as soluções contendo DNA foram medidas por espectrofotometria. Os resultados para cada matriz encontram-se na Tabela 3.

Observa-se que em 36,7% dos grupos de amostras apresentaram uma média de leitura a 260nm menor que 20ng/μL e não puderam ser quantificados por espectrofotometria, provavelmente devido à alta degradação do DNA decorrente do processamento. Essas matrizes compõem um grupo de subprodutos como amido, maltodextrina, dextrose de milho, xarope de glicose, gordura vegetal, e lecitina de soja; e produto terminados com alto processamento como cereais matinais e bebida UHT à base de soja de diversos sabores.

Um segundo grupo de amostras, que representa 17,5% do total de amostras extraídas, e caracterizadas por médio grau de processamento ou alto conteúdo proteico como bebida UHT à base de soja do tipo “original”, barra de cereal, quirera de milho, semolina de milho e amostras de leite em pó, tiveram seu DNA quantificado entre 20 ng/μL e 99 ng/μL.

Já um terceiro grupo de amostras, 15,1% do total, apresentou uma média de quantificação por espectrofotometria entre 100 ng/μL e 249 ng/μL. Essas amostras compunham amostras de médio a pouco processamento, como biscoitos de variados sabores, farinha de aveia, farinha de milho, e grão de milho integral.

Tabela 3. Rendimento de DNA das amostras obtido pela leitura a 260nm em espectrofotômetro.

Amostra	Amostras analisadas ¹	Média da concentração de DNA de três leituras (ng/μL) ²
Amido de arroz	2	<20
Amido de batata	1	<20
Amido de mandioca	2	<20
Amido de milho	13	<20
Arroz em grão	4	494
Barra de cereal	2	45
Bebida UHT à base de soja de variados sabores	2	<20
Bebida UHT à base de soja sabor "Original"	5	55
Biscoito de variados sabores	4	213
Cereal infantil de variados sabores	14	510
Cereal matinal de variados sabores	22	45
Dextrose de milho	3	<20
Farelo de trigo	1	724
Farinha de arroz	7	758
Farinha de aveia	4	310
Farinha de centeio	2	315
Farinha de cevada	5	295
Farinha de milho	5	126
Farinha de trigo	7	558
Fibra de milho	3	447
Gordura vegetal	2	<20
Grão de milho integral	6	213
Lecitina de soja	8	<20
Leite em pó	13	47
Maltodextrina	5	<20
Mix de cereais	3	317
Proteína isolada de soja	6	1439
Quirera de milho	3	43
Semolina de milho	6	62
Trigo vermelho em grão	3	781
Xarope de glicose de milho	5	<20

¹ Foram realizados ensaios em duplicata para extração de DNA em cada amostra. ² O valor foi calculado considerando a média de três leituras a 260nm de cada uma das duplicatas e a média de todas as replicatas para cada tipo de amostra.

Por fim, um quarto grupo, composto por 30,7% das amostras, teve um rendimento de DNA acima de 250 ng/μl. Tais amostras compreendem proteína isolada de soja, arroz em grão e quebrado, farelo de trigo, farinha de arroz, farinha

de trigo, de centeio e de cevada, fibra de milho, mix de cereais (aveia, cevada, trigo e arroz), trigo em grão, e cereal infantil.

4.3 Determinação da pureza do DNA

Para a medição da pureza do DNA extraído foram consideradas as médias de leitura espectrofotométrica entre todas as replicatas para cada matriz, excluindo-se as amostras com leitura abaixo de 20ng/μL. Os resultados encontram-se na Figura 6.

Os valores foram calculados considerando a média de três leituras a 260nm de cada uma das duplicatas e a média de todas as replicatas para cada tipo de amostra.

Figura 6. Grau de pureza do DNA extraído para cada tipo de matriz.

Como mencionado anteriormente, o DNA é considerado “puro” quando a razão entre as leituras à 260 nm A_{260} e à 280 nm A_{280} em luz UV estão entre 1.7 e 2.0. Os resultados apontam que 23,8% das médias de leitura dessas amostras ficaram nessa faixa. O restante ficou concentrado na faixa acima de 2.0, indicando presença de RNA nos extratos.

4.4 Especificidade dos *primers* e sondas

O DNA extraído das amostras de referência foi amplificado através da reação de PCR em tempo real. Todas as sequências selecionadas foram específicas para a reação de interesse.

Tabela 4. Reações de especificidade para os genes-alvo lectina, zeína, prolamina, WpepCi1, hsp-cry1Ab e CTP4 por PCR em tempo real.

Gene/Analito	Soja RRS <0.03% (3)	Milho 100% (5)	Arroz 100% (5)	Trigo 100% (4)	Soja RRS 0.1% (5)	Milho MON810 0.1% (5)
Lectina	12.1	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.	11.6	Indeterm.
Zeína	Indeterm.	13.5	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.	13.7
Prolamina	Indeterm.	Indeterm.	12.7	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.
WpepCi1	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.	17.6	Indeterm.	Indeterm.
p-35S	29.7	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.	23,8	26.9
t-NOS	29.7	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.	26.0	Indeterm.
CP4EPSPS	29.7	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.	25.6	Indeterm.
CTP4	29.8	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.	26.1	Indeterm.
Hsp-cry1Ab	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.	Indeterm.	26.3

Os valores apresentados são CTs médios calculados a partir dos resultados das análises em (x) replicatas.

4.5 Análises de PCR em tempo real

Todas as amostras que tiveram seu DNA extraído foram submetidas à reação de amplificação pela técnica de PCR em tempo real. As sequências-alvo para as amostras foram: lectina, zeína, gene WpepCi1, prolamina, promotor p-35S, terminador t-NOS, gene CP4EPSPS, e as sequências específicas para os eventos MON810 e RRS.

Após amplificação, detecção da fluorescência e cálculo do valor C_T (Apêndice B), os resultados para a detecção positiva para cada amostra, analisada em duplicata, encontram-se na Tabela 5. Foram consideradas como “detectadas” as amostras com valor C_T abaixo de 30 para as duas duplicatas. Para o evento

MON810 foi considerado a detecção positiva a amplificação para os genes zeína, P-35S, o gene específico hsp-cry1Ab. Já a detecção foi positiva para o evento soja RRS, quando os genes lectina, P-35-S, CP4EPSPS, e o gene específico CTP4 foram amplificados.

Tabela 5. Amostras com amplificação positiva para os genes-alvo lectina, zeína, prolamina, WpepCi1, hsp-cry1Ab e CTP4 por PCR em tempo real.

Amostra	Cultura principal	Nº de análises (em duplicata) ¹	Detecção para soja (lectina)	Detecção para milho (zeína)	Detecção para arroz (prolamina)	Detecção para trigo (WpepCi1)	Detecção para milho GM MON810 (hsp-cry1Ab)	Detecção para soja GM RRS (CTP4)
Amido de arroz	Arroz	2	1	2	1	-	-	-
Amido de batata	Batata	1	-	-	1	1	-	-
Amido de mandioca	Mandioca	2	-	-	-	-	-	-
Amido de milho	Milho	13	10	13	3	2	9	10
Arroz em grão	Arroz	4	-	-	4	-	-	-
Barra de cereal	Vários	2	2	2	2	2	2	2
Bebida UHT à base de soja de variados sabores	Soja	3	3	1	-	-	1	1
Bebida UHT à base de soja sabor "Original"	Soja	4	4	2	-	-	2	3
Biscoito de variados sabores	Trigo	4	4	4	2	4	-	4
Cereal infantil	Arroz	5	-	3	5	3	-	-
Cereal infantil	Arroz/Aveia	3	-	3	3	3	-	-
Cereal infantil	Milho	3	3	3	3	3	3	2
Cereal infantil	Vários	3	3	3	3	3	2	1
Cereal matinal	Milho/Arroz	22	6	20	14	5	4	1
Dextrose de milho	Milho	3	-	-	-	-	-	-
Farelo de trigo	Trigo	1	1	-	-	1	-	1
Farinha de arroz	Arroz	7	-	-	7	-	-	-
Farinha de aveia	Aveia	4	-	-	2	-	-	-
Farinha de centeio	Centeio	2	-	-	2	2	-	-
Farinha de cevada	Cevada	5	1	1	2	4	1	1

(continua)

Amostra	Cultura principal	Nº de análises (em duplicata) ¹	Detecção para soja (lectina)	Detecção para milho (zeína)	Detecção para arroz (prolamina)	Detecção para trigo (WpepCi1)	Detecção para milho GM MON810 (hsp-cry1Ab)	Detecção para soja GM RRS (CTP4)
Farinha de milho	Milho	5	3	5	3	2	4	1
Farinha de trigo	Trigo	7	7	4	1	7	-	7
Fibra de milho	Milho	3	3	3	3	-	3	1
Gordura vegetal	Vários	2	-	-	-	-	-	-
Grão de milho integral	Milho	6	3	6	4	2	1	-
Lecitina de soja	Soja	8	6	2	1	2	-	2
Leite em Pó	-	13	-	3	2	-	-	-
Maltodextrina	Milho	5	-	-	-	-	-	-
Mix de cereais	Vários	3	2	3	3	3	-	-
Proteína isolada de soja	Soja	6	6	1	-	-	-	4
Quirera de milho	Milho	3	3	3	2	1	3	-
Semolina de milho	Milho	6	4	6	3	1	5	-
Trigo vermelho em grão	Trigo	3	-	1	-	3	-	-
Xarope de glicose de milho	Milho	5	-	-	-	-	-	-

¹ Cada duplicata das reações de PCR foram realizadas a partir de cada uma das duplicatas do ensaio de extração para uma amostra. Os valores em porcentagem referem-se à quantidade de relativa de amostras cuja detecção foi positiva (valor CT <30) para ambas as duplicatas.

Segundo a composição de cada amostra, esperava-se que houvesse uma amplificação positiva para o gene-alvo para matriz principal como um indicativo de reação positiva de amplificação por PCR em tempo real, a saber: gene da lectina para amostras com soja, gene da zeína para amostras com milho, gene da prolamina para amostras com arroz e gene WpepCi1 para amostras com trigo em sua composição.

Apesar dos extratos de DNA apresentarem RNA, de acordo com os valores de leitura a 260nm e 280nm, a reação de PCR em tempo real ocorreu em todas as amostras cuja leitura espectrofotométrica indicava presença de DNA (acima de 20ng/μL).

Observa-se que houve a amplificação do gene lectina em todas as amostras de bebida UHT à base de soja, tanto do sabor “Original” quanto aquelas com diversos sabores, e proteína isolada de soja. Para as amostras de lecitina de soja, a amplificação do gene da lectina ocorreu em 75% das amostras analisadas.

A detecção do gene zeína ocorreu em todas as replicatas testadas cuja composição possui milho como amido de milho, farinha de milho, fibra de milho, grão de milho integral, quirera de milho, cereal infantil à base de milho, e semolina de milho. Para os cereais matinais, o gene foi amplificado em 90% das amostras testadas. Para as amostras de dextrose de milho, maltodextrina e xarope de glicose de milho, não houve detecção de zeína em nenhuma das amostras, indicando ausência do gene nos extratos de DNA.

O gene prolamina foi amplificado em todas as amostras de grão de arroz, farinha de arroz, e cereais infantis à base de arroz e arroz e trigo; enquanto que para as amostras de amido de arroz, a detecção ocorreu em apenas 50% das amostras. Não houve detecção de prolamina na amostra de cereal matinal cuja composição principal é o arroz.

Já o gene WpepCi1 para detecção de trigo foi amplificado em todas as amostras como biscoitos de variados sabores, farelo de trigo, farinha de trigo e trigo vermelho em grão.

As amostras cuja composição engloba diversos tipos de cultura como barra de cereal, gordura vegetal, mix de cereais e cereal infantil tiveram amplificação positiva para todos os genes endógenos testados; exceto no caso das amostras de gordura vegetal, cuja amplificação não foi observada em nenhuma das sequências-alvo.

A detecção para milho GM MON810 foi observada em 23,8% e de soja GM RRS, em 24,4% das amostras testadas.

Em 17,3% das amostras que compreenderam amido de mandioca, cereal matinal à base de arroz, gordura vegetal, maltodextrina e xarope de glicose de milho, não houve qualquer amplificação dos genes endógenos, exógenos ou marcadores (p-35S, t-NOS e CP4EPSPS). Esta porcentagem inclui resultados de

determinados grupos de amostras cujas algumas replicatas também não apresentaram qualquer amplificação, como leite em pó (8 em 13 amostras), farinha de aveia (1 em 4 amostras), lecitina de soja (2 em 8 amostras).

Por fim, em apenas uma amostra de farinha de aveia houve a detecção para um marcador de transgenia (p-35S) e não detecção para milho GM MON810 ou soja GM RRS, indicando provável presença do vírus mosaico da couve-flor.

4.6 Avaliação de contaminação entre culturas

Como visto anteriormente, as 168 amostras foram analisadas visando a detecção dos genes endógenos lectina, zeína, prolamina, e WpepCi1 nas culturas de soja, milho, arroz e trigo, respectivamente. As amostras foram testadas também para a detecção de milho GM MON180 e soja GM RRS, confirmadas pela detecção simultânea dos marcadores preliminares de transgenia p-35S, t-NOS e CP4EPSPS e específicos hsp-cry1Ab e CTP4.

De acordo com a Tabela 6, observam-se as proporções das detecções positivas para cada um dos alvos, para amostras derivadas de soja, milho, arroz, trigo e em amostras complexas contendo ingredientes de várias origens.

Em aproximadamente um terço das amostras cuja cultura principal presente era a soja, houve a detecção simultânea de outras culturas. Em metade das amostras cuja detecção para lectina foi positiva, a soja GM RRS esteve presente. Esta proporção foi semelhante para detecção de milho GM MON810 em relação à detecção de outras culturas GM que não fosse soja.

Tabela 6. Comparação entre as detecções em porcentagem para a cultura principal (GM e não-GM), e para uma ou mais culturas (GM e não-GM) diferentes da principal.

Cultura principal	Nº de determinações (em duplicata) ¹	Deteccção para cultura principal	Deteccção para cultura-GM principal	Razão GM/não-GM	Deteccção para uma ou mais culturas	Deteccção para outras culturas-GM	Razão GM/não-GM
Soja	21	90%	48%	53%	29%	14%	50%
Milho	73	79%	44%	55%	48%	21%	43%
Arroz	19	89%	-	-	26%	0%	0%
Trigo	15	100%	-	-	80%	80%	100%

¹ Cada duplicata das reações de PCR foram realizadas a partir de cada uma das duplicatas do ensaio de extração para uma amostra. Os valores em porcentagem referem-se à quantidade de relativa de amostras cuja detecção foi positiva (valor $C_T \leq 30$) para ambas as duplicatas.

Segundo a Tabela 5, amostras de bebida UHT à base de soja tiveram detecção para milho sendo que em todas elas o milho GM MON810 foi detectado. No caso da lecitina de soja, milho, arroz e trigo foram detectados, porém em nenhuma das amostras houve detecção para milho GM MON810. E para as amostras de proteína isolada de soja, houve a detecção de milho em apenas uma das amostras e em nenhuma delas ocorreu a presença do milho GM.

Para as amostras cuja cultura principal presente era o milho, aproximadamente metade apresentou detecção positiva para milho GM MON810. Além de milho, houve a detecção de outras culturas em aproximadamente metade das amostras, sendo 43% delas com amplificação para soja GM RRS.

As amostras de amido de milho foram as que apresentaram maior ocorrência de outras culturas sendo que dez em treze amostras tiveram detecção para soja GM RRS. Para as amostras de farinha de milho, todas as culturas também tiveram presentes embora em apenas uma amostra houvesse detecção para soja GM RRS. Uma situação semelhante ocorreu para o ensaio com fibra de milho, embora trigo não tenha sido detectado em nenhuma das amostras. Para as amostras de grão de milho, quirera de milho e semolina de milho, todas as culturas testadas estiveram presentes, embora com nenhuma detecção positiva para soja GM RRS. Por fim, para as amostras de cereal infantil à base de milho, todas as culturas foram detectadas, bem como soja GM RRS.

Já para as amostras com composição principal de arroz, em 26% delas houve detecção também para outras culturas; no entanto, com nenhuma ocorrência de milho GM MON810 ou soja GM RRS.

Todas as amostras com constituição de trigo, englobando biscoitos de variados sabores, farelo de trigo, farinha de trigo e trigo vermelho em grão, tiveram também detecção de outras culturas, e destas, todas apresentaram detecção positiva para soja GM RRS. Somente a última categoria revelou apenas detecção da presença de trigo.

Outras amostras cuja composição principal envolvia outras culturas, também houve a presença de soja, milho, arroz ou trigo; como farinha de aveia (detecção para arroz), amido de batata e farinha de centeio (detecção para arroz e trigo), e amido de mandioca (detecção para milho). Outras amostras com composição complexa também apresentaram detecção para todas as culturas, como barra de cereal, mix de cereais, cereal matinal e cereal infantil à base de variados cereais.

A compilação dos resultados para avaliação das culturas presentes nas amostras encontra-se na Figura 7.

Figura 7. Detecção dos genes da lectina (soja), zeína (milho), prolamina (arroz) e W-pepCi1 (trigo) em amostras cujas matrizes principais são soja, milho, arroz, trigo ou culturas variadas (outros).

4.7 Resultados de análises quantitativas das amostras individuais e amostra global e avaliação estatística do plano de amostragem

Nas amostras de bebida UHT, à base de soja, replicatas individuais de 1000 mL foram analisadas para avaliação da extensão da quantidade do evento GM em três lotes amostrados. Para as análises quantitativas foram construídas curvas padrão com emprego de materiais de referência de soja RRS, cujo DNA foi extraído segundo item 3.2.3. Os valores C_T s das amostras foram construídas curvas padrão, cujas linearidade (acima de 0.98) e inclinação da reta (entre -3.1 e -3.9) ficaram dentro dos valores esperados, indicando boa performance das reações de PCR (Figura 8 e Tabela 7).

(continua)

(a)

(b)

(c)

Figura 8. Curvas padrão para o gene endógeno marcado com a fluorescência FAM e para o gene exógeno marcado com a fluorescência VIC para a reação de quantificação das amostras da coleta 1 (a), coleta 2 (b) e coletas 3 (c).

Os resultados da quantificação foram obtidos através dos valores de inclinação e intersecção da reta das curvas-padrão e os valores C_T s das amostras (Tabela 7).

Tabela 7. Cálculo de quantificação relativa das amostras a partir dos valores de inclinação de reta e intersecção de reta das curvas padrão do gene exógeno (FAM) e gene endógeno (VIC).

Amostra	C _T FAM	Inclinação de reta (b)	Intersecção de reta (a)	Concent. (X)	C _T VIC	Inclinação de reta (b)	Intersecção de reta (a)	Concent. (Y)	% Relativa (X/Y)
(1) 10:15	30,355	-3,633	22,802	0,008	23,852	-3,628	24,719	1,734	0,48
(1) 10:15	29,889	-3,633	22,802	0,011	23,915	-3,628	24,719	1,666	0,67
(1) 02:04	31,563	-3,633	22,802	0,004	25,504	-3,628	24,719	0,608	0,64
(1) 02:04	31,368	-3,633	22,802	0,004	24,726	-3,628	24,719	0,996	0,44
(1) 15:17	36,018	-3,633	22,802	0,000	25,594	-3,628	24,719	0,574	0,04
(1) 15:17	37,132	-3,633	22,802	0,000	25,717	-3,628	24,719	0,531	0,02
(1) 11:21	30,251	-3,633	22,802	0,009	21,789	-3,628	24,719	6,421	0,14
(1) 11:21	29,526	-3,633	22,802	0,014	22,022	-3,628	24,719	5,538	0,25
(1) 18:15	30,867	-3,633	22,802	0,006	21,833	-3,628	24,719	6,245	0,10
(1) 18:15	30,855	-3,633	22,802	0,006	21,923	-3,628	24,719	5,898	0,10
(1) 04:16	30,663	-3,633	22,802	0,007	23,590	-3,628	24,719	2,047	0,34
(1) 04:16	30,611	-3,633	22,802	0,007	23,952	-3,628	24,719	1,627	0,44
(1) 03:00	31,876	-3,633	22,802	0,003	24,791	-3,628	24,719	0,955	0,33
(1) 03:00	31,673	-3,633	22,802	0,004	24,461	-3,628	24,719	1,178	0,31
(1) 08:15	31,586	-3,633	22,802	0,004	25,663	-3,628	24,719	0,549	0,70
(1) 08:15	32,529	-3,633	22,802	0,002	25,439	-3,628	24,719	0,633	0,33
(1) 09:15	31,031	-3,633	22,802	0,005	24,331	-3,628	24,719	1,279	0,42
(1) 09:15	31,435	-3,633	22,802	0,004	24,301	-3,628	24,719	1,304	0,32
(1) 16:18	33,457	-3,633	22,802	0,001	23,853	-3,628	24,719	1,732	0,07
(1) 16:18	32,556	-3,633	22,802	0,002	23,400	-3,628	24,719	2,309	0,09
(2) 06:50	31,626	-3,635	23,041	0,004	25,377	-3,532	24,695	0,641	0,68
(2) 06:50	32,485	-3,635	23,041	0,003	25,724	-3,532	24,695	0,511	0,49
(2) 07:12	32,155	-3,635	23,041	0,003	25,333	-3,532	24,695	0,660	0,47
(2) 07:12	31,947	-3,635	23,041	0,004	25,387	-3,532	24,695	0,637	0,56
(2) 07:48	32,468	-3,635	23,041	0,003	25,742	-3,532	24,695	0,505	0,50
(2) 07:48	32,402	-3,635	23,041	0,003	25,586	-3,532	24,695	0,559	0,48
(2) 13:24	33,256	-3,635	23,041	0,002	26,518	-3,532	24,695	0,305	0,51
(2) 13:24	33,353	-3,635	23,041	0,001	26,241	-3,532	24,695	0,365	0,40
(2) 14:21	32,915	-3,635	23,041	0,002	25,821	-3,532	24,695	0,480	0,40
(2) 14:21	32,799	-3,635	23,041	0,002	25,877	-3,532	24,695	0,463	0,45
(2) 15:12	32,352	-3,635	23,041	0,003	25,468	-3,532	24,695	0,604	0,45
(2) 15:12	32,761	-3,635	23,041	0,002	25,411	-3,532	24,695	0,627	0,34
(2) 16:34	31,353	-3,635	23,041	0,005	25,121	-3,532	24,695	0,758	0,68
(2) 16:34	31,948	-3,635	23,041	0,004	24,977	-3,532	24,695	0,832	0,43
(2) 20:39	32,103	-3,635	23,041	0,003	25,308	-3,532	24,695	0,670	0,48
(2) 20:39	32,938	-3,635	23,041	0,002	25,224	-3,532	24,695	0,708	0,27
(2) 21:41	31,224	-3,635	23,041	0,006	24,890	-3,532	24,695	0,881	0,64
(2) 21:41	31,013	-3,635	23,041	0,006	25,004	-3,532	24,695	0,818	0,78
(2) 22:05	31,728	-3,635	23,041	0,004	24,990	-3,532	24,695	0,825	0,49
(2) 22:05	31,966	-3,635	23,041	0,004	25,028	-3,532	24,695	0,805	0,44
(3) 03:25	32,325	-3,505	23,440	0,003	24,212	-3,624	24,790	1,444	0,20
(3) 03:25	31,065	-3,505	23,440	0,007	24,299	-3,624	24,790	1,366	0,49
(3) 03:33	32,012	-3,505	23,440	0,004	24,407	-3,624	24,790	1,276	0,28
(3) 03:33	32,376	-3,505	23,440	0,003	24,298	-3,624	24,790	1,367	0,21
(3) 03:40	31,400	-3,505	23,440	0,005	24,163	-3,624	24,790	1,490	0,36
(3) 03:40	32,493	-3,505	23,440	0,003	24,369	-3,624	24,790	1,306	0,20

(continua)

Amostra	C _T FAM	Inclinação de reta (b)	Intersecção de reta (a)	Concent. (X)	C _T VIC	Inclinação de reta (b)	Intersecção de reta (a)	Concent. (Y)	% Relativa (X/Y)
(3) 04:05	32,035	-3,505	23,440	0,004	24,224	-3,624	24,790	1,433	0,25
(3) 04:05	31,952	-3,505	23,440	0,004	24,251	-3,624	24,790	1,409	0,26
(3) 04:41	32,796	-3,505	23,440	0,002	24,289	-3,624	24,790	1,375	0,16
(3) 04:41	33,282	-3,505	23,440	0,002	24,125	-3,624	24,790	1,526	0,10
(3) 05:14	34,271	-3,505	23,440	0,001	25,013	-3,624	24,790	0,868	0,09
(3) 05:14	34,516	-3,505	23,440	0,001	24,527	-3,624	24,790	1,182	0,06
(3) 05:41	30,615	-3,505	23,440	0,009	23,926	-3,624	24,790	1,731	0,52
(3) 05:41	31,817	-3,505	23,440	0,004	24,245	-3,624	24,790	1,414	0,29
(3) 07:01	30,947	-3,505	23,440	0,007	25,606	-3,624	24,790	0,596	1,21
(3) 07:01	31,917	-3,505	23,440	0,004	24,856	-3,624	24,790	0,959	0,40
(3) 07:17	30,383	-3,505	23,440	0,010	24,789	-3,624	24,790	1,001	1,04
(3) 07:17	31,327	-3,505	23,440	0,006	24,509	-3,624	24,790	1,196	0,47
(3) 07:27	32,006	-3,505	23,440	0,004	24,634	-3,624	24,790	1,105	0,33
(3) 07:27	32,327	-3,505	23,440	0,003	24,824	-3,624	24,790	0,979	0,30

Os valores de quantificação encontrados foram transportados para gráfico conforme o horário de coleta da amostra. Uma variação quanto à quantificação foi encontrada durante a produção (Figura 9).

Figura 9. Variação da quantificação relativa de soja GM RRS em 10 amostras de bebida UHT à base de soja “original” coletadas em diferentes horários. Os valores correspondem aos valores de quantificação em % (eixo y) obtidos pela média de cada duplicata e as respectivas amplitudes em diferentes horários de coletas (eixo x).

O valor de quantificação relativa obtido após subamostragem, homogeneização e formação de amostra global foi comparado com os resultados de quantificação da amostra global, a fim de se verificar sua representatividade. Para aplicação do teste t-Student, foi necessário averiguar se as replicatas possuíam uma distribuição normal. Segundo o teste, a hipótese de normalidade não pode ser rejeitada (Figura 10).

Como o valor t obtido foi menor que o valor P (Tabela 8), a hipótese H_0 não pode ser rejeitada e, portanto, o resultado da amostra global das 10 replicatas foi representativo.

Tabela 8. Cálculo de teste t-Student bicaudal para uma amostra. Os valores da tabela representam os valores das 10 replicatas: média (m), desvio-padrão (s), número de replicatas (n) e valor t. O nível de significância foi obtido através da tabela T-student para 9 graus de liberdade e aplicado para as coletas 1, 2 e 3.

Coleta	Resultado amostra global	μ	s	$\bar{x}-\mu_0$	$\sqrt{n}$	$s/\sqrt{n}$	t
1	0,40	0,312	0,201	0,070	3,162	0,063	1,164
2	0,44	0,469	0,100	0,056	3,162	0,032	1,776
4	0,23	0,361	0,241	0,131	3,162	0,076	1,715

Graus de liberdade = n - 1 = 9

Nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) = 1,833

```
> y<-c(0.58,0.54,0.03,0.2,0.1,0.39,0.32, 0.51,0.37,0.08)
> y
[1] 0.58 0.54 0.03 0.20 0.10 0.39 0.32 0.51 0.37 0.08
> x<-rnorm(n=10,m=0.31174,sd=0.20123)
> x
[1] 0.28265841 -0.02782041 0.22466397 0.48352731
0.34873268 -0.14540655
[7] 0.53660520 0.32757464 0.60031620 0.39494576
> qqplot(x,y)
> abline(0,1)
> shapiro.test(y)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: y
W = 0.9261, p-value = 0.4105
```

(a)

```
>y<c(0.59,0.51,0.49,0.45,0.42,0.40,0.55,0.37,0.71,
0.46)
> y [1] 0.59 0.51 0.49 0.45 0.42 0.40 0.55 0.37 0.71
0.46
> x<-rnorm(n=10,m=0.50,sd=0.10043)
> x [1] 0.6388159 0.5144613 0.3666398 0.7442770
0.6499672 0.5695179 0.4600054
[8] 0.5797668 0.5784462 0.3549206
> qqplot(x,y)
> abline(0,1)
> shapiro.test(y)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: y
W = 0.939, p-value = 0.5423
```

(b)

```
> y<c(0.35,0.24,0.28,0.26,0.13,0.08,0.40,0.81,
0.76,0.31)
> y [1] 0.35 0.24 0.28 0.26 0.13 0.08 0.40 0.81 0.76 0.31
> x<-rnorm(n=10,m=0.36,sd=0.241779)
> x [1] 0.53351764 0.33998105 0.74526402 0.02510077
0.23957841 0.22773158
[7] 0.31944278 0.01098148 0.38493379 0.54017175
> qqplot(x,y)
> abline(0,1)
> shapiro.test(y)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: y
W = 0.8556, p-value = 0.0677
```

(c)

Figura 10. Cálculo de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk dos valores da coleta 1 (a), 2 (b) e 3 (c). Considerando $W_{\text{calc}} > W_{\text{tab}} = 0.809$ e um $\alpha = 0,05$, P (p-value) $> 0,05$; portanto a hipótese de normalidade não pode ser rejeitada com um grau de confiança de 95%.

5 DISCUSSÃO

5.1 Extração e rendimento de DNA de amostras de alimentos com diferentes graus de processamento e a performance da análise de PCR em tempo real

Os alimentos são submetidos a várias etapas durante o processo de produção que degradam as moléculas de DNA presentes. Essa degradação pode ser parcial ou total. A leitura em espectrofotômetro limita-se à detecção, mas não permite a distinção dos estados do DNA, de forma que, só é possível avaliar se a amostra é passível de análise por PCR em tempo real após a verificação do tamanho dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose ou pela própria análise por PCR.

As amostras de dextrose de milho, gordura vegetal, maltodextrina e xarope de milho e duas amostras de lecitina de soja não tiveram rendimento de DNA após a extração mensurável pela leitura a 260nm por espectrofotômetro nem puderam ser analisadas por PCR em tempo real, que apresentaram valores C_T indeterminados. Nestes casos, o DNA encontrava-se totalmente degradado pelo processamento. Os processos de prensagem do milho e da soja para obtenção do óleo, e as últimas etapas de processamento do amido de milho parecem ser críticas para destruição das moléculas de DNA e consequente impossibilidade de extração e amplificação por PCR.

No caso das amostras de amido de arroz, de batata e de milho, de cereais matinais e da bebida UHT à base de soja de variados sabores, não houve leitura espectrofotométrica; no entanto, o DNA foi detectado por PCR em tempo real para algum dos genes-alvo, indicando que o DNA estava fragmentado, porém não totalmente degradado.

Um caso a parte é o amido de mandioca, no qual não houve leitura de concentração nem amplificação por PCR em tempo real para os genes-alvo, que

não incluíam nenhuma sequência específica para mandioca. Neste caso, não houve como avaliar sobre a integridade das moléculas de DNA.

Para estas amostras cujas leituras por espectrofotômetro foram menores que 20ng/μl tiveram resultados confirmados por aqueles encontrados por CONTRI (2006), cujas amostras de óleo de soja, amido, óleo de milho, maltodextrina, dextrose, xarope de frutose, xarope de glicose e outras matrizes com alto grau de processamento, não tiveram seu DNA quantificável por espectrofotometria após extração por dois métodos diferentes (CTAB e coluna de sílica). Para todas essas amostras, exceto para as amostras de amido, o gene de referência da invertase não foi amplificado por reação de PCR e visualização em gel de eletroforese.

A escolha de sequências-alvo de pequeno tamanho também favorece a amplificação mesmo em casos de alta fragmentação do DNA. No presente estudo, o maior tamanho de amplicon escolhido foi de 121 pares de bases (gene WpepCi1).

Os resultados apontaram que as farinhas, farelos e grãos não processados, tiveram alta manutenção das moléculas de DNA, apresentando altas leituras espectrofotométricas, provavelmente devido ao pouco processamento, que envolve somente a lavagem dos grãos e moagem. Produtos feitos com farinhas como no caso de cereais infantis e biscoitos também tiveram bom rendimento da extração de DNA. Os biscoitos, mesmo após o assamento, mantiveram fragmentos de DNA amplificáveis como obtido por GRAYSON et al. (2007) com um rendimento de aproximadamente 200ng/μL.

Seis amostras de lecitina e todas as amostras de bebida UHT à base de soja apresentaram leitura espectrofotométrica menor que 20 ng/μL, porém para ambos o DNA extraído pôde ser amplificado por PCR em tempo real. A lecitina é fabricada após a remoção do óleo bruto do grão de soja, enquanto que o leite de soja, utilizado na produção das bebidas UHT à base de soja, é extraído por um processo de moagem úmida. A porção protéica da soja, após a remoção do óleo, dá origem à farinha e isolados protéicos. Essas últimas possuem uma grande porção de DNA não fragmentado, como foi observado na leitura de concentração por espectrofotômetro.

Para as amostras de maltodextrina, dextrose de milho, xarope de glicose de milho, e gordura vegetal, o DNA totalmente degradado impede o controle da presença e quantidade de OGMs através da análise laboratorial. Neste caso, a rotulagem dos produtos fabricados com estes ingredientes se torna dúbia e uma inspeção mais detalhada necessita ser realizada através da rastreabilidade do processo de produção e não pelo produto final através da exigência pelos fabricantes e órgãos de fiscalização de laudos analíticos de análise da matéria-prima bruta.

5.2 Contaminação por presença adventícia não-GM e GM nos alimentos à base de soja, milho, arroz e trigo

Para alimentos cuja composição de matérias-primas originárias de soja ou milho como farinhas e outros subprodutos, a contaminação por outras culturas é esperada, pois a presença adventícia de sementes entre culturas diferentes é inevitável, sendo uma situação comum na agricultura. No caso dos OGMs duas situações podem ocorrer: a contaminação de lotes de sementes não-GM com lotes GM no mesmo tipo de cultura, e a contaminação de lotes de sementes não-GM com lotes GM de culturas diferentes.

No primeiro caso, o controle da presença adventícia de sementes GM é dependente de interesses comerciais e da demanda de sementes não-GM. Em 2009 o país passou a apresentar a segunda maior produção de grãos GM no mundo (ISAAA, 2010), porém, apesar das vantagens da adoção de culturas GM, existe uma demanda de importadores e das indústrias de alimentos por matérias-primas não-GM, e reforça a importância do controle do conteúdo de OGMs nos produtos e atendimento às regras de rotulagem especial.

Atualmente o Brasil é líder na exportação de grãos não-GM (ABRANGE, 2011). Em 2010, a ABNT promoveu uma reunião para a constituição da Comissão de Estudos Especial de Grãos não-GM (ABNT/CEE-143), para discutir o estabelecimento de regras técnicas para a cadeia de produção e controle de qualidade dos grãos. Muitas empresas de produção e beneficiamento de grãos

buscam pela certificação, que é um dos mecanismos de garantia da qualidade que pode ser usado nos sistemas agroindustriais e é uma forma de transmitir informações sobre a segurança do produto baseada em um documento ou certificado formal (NASSAR, 1999; LATADO et al., 2003).

Nestes sistemas de certificação, o controle da presença adventícia de sementes GM passa a ser de grande importância e uma ferramenta de garantia da qualidade do produto. Estudos estatísticos têm sido desenvolvidos para a avaliação da quantidade de material GM e para atendimento de regras pré-estabelecidas de padrões de “pureza” em lotes de grãos convencionais (LAFFONT, 2005).

No segundo caso, no qual culturas GM diferentes da cultura principal podem ocorrer na forma de grãos não-GM e GM, e que normalmente não são monitoradas quanto à sua presença. Como visto através dos resultados, metade das matérias-primas produzidas a partir de milho continham soja e um pouco menos que um quarto delas, soja GM RRS. Para as matrizes compostas por soja, um terço continha milho, e este era metade composto por milho GM MON810. Cerca de 100% das amostras de farinha de trigo apresentaram detecção para soja GM RRS.

As potenciais fontes de presença adventícia são o espalhamento de pólen entre campos vizinhos e polinização cruzada, mistura cruzada durante a produção de sementes, presença remanescente de culturas de outras safras, colheita e o processamento pós-colheita, como transporte e armazenagem nos silos (ENDRES, 2005).

No caso das amostras derivadas de trigo, pode-se explicar a presença de soja GM RRS devido à adição de soja no branqueamento da farinha de trigo. Uma alta ocorrência de soja GM RRS já havia sido observada também por FERREIRA et. al (2009) em amostras derivadas de trigo obtidas do mercado brasileiro.

Na Europa, uma estimativa da presença adventícia de milho GM representa uma taxa de 0,57% na somatória de todas as etapas de produção do milho, da produção de sementes à armazenagem, e considerando a adoção de boas práticas de agricultura, incluindo o isolamento das culturas e segregação de produtos (RÜHL, 2007).

As questões em torno da presença adventícia de culturas GMs e não-GMs envolvem também as interpretações das legislações de utilização e rotulagem de alimentos GM. Normalmente, os resultados de quantificação de OGMs são expressos de forma relativa, ou seja, a concentração de DNA-GM em relação a DNA-total na amostra. Quando uma cultura se encontra presente na matéria-prima de forma não intencional, é passível de ser detectada e quantificada, dependendo da sensibilidade de limite de detecção e quantificação do método. Nos casos nos quais traços de culturas adventícias presentes na amostra são constituídos por material-GM, estes podem ultrapassar o limite de tolerância de 1%, e enquadrar o produto na obrigatoriedade de rotulagem especial (Figura 11). Pode-se dizer ainda que quanto menores as quantidades a serem testadas, maiores são as chances de se obter um valor elevado na quantificação relativa.

Na utilização de métodos menos sensíveis para análise de OGMs como imunoenaios ELISA, de fluxo lateral e o Western blot, que apresentam um limite de detecção de aproximadamente 0,1-1%, a detecção de traços de OGMs nas amostras não é possível, inviabilizando uma abordagem maior de avaliação de presença adventícia de culturas. Ensaio mais simples e de menor custo que aqueles envolvendo a análise de ácidos nucleicos e altamente dependentes de grande infra-estrutura laboratorial são ainda utilizados, mas não são suficientes para a esta abordagem.

Atualmente no Brasil existe somente uma instrução normativa que trata da detecção, identificação e quantificação da presença adventícia de sementes de algodão-GM em sementes não-GM (MAPA, 2006), e aprova, em caráter provisório, a adoção de kits de fluxo lateral com limites de detecção para os marcadores de transgenia (CP4EPSPS, PAT, BAR e Cry1Ac) variando de 0,10% a 1,0%. Por não se tratar de um tipo de gênero alimentício, e não estar incluso na obrigatoriedade de rotulagem especial, a adoção de métodos de análise mais simples e com maior limite de detecção serve ao seu propósito e facilita o controle por produtores e exportadores.

Figura 11. Detecção e quantificação de OGMs em amostras com diferentes concentrações de soja e milho. Na amostra (a), soja e milho aparecem em igual concentração na composição da amostra, diferentemente das amostras (b) e (c), cuja presença de soja é adventícia. Na amostra (b), o método não é capaz de detectar a soja presente devido ao alto limite de detecção do método; enquanto que na amostra (c), o método é muito sensível, e além de detectar é capaz de quantificar o conteúdo de soja-GM.

Desta forma, seria interessante um tratamento específico para casos de contaminação por presença adventícia de OGMs na legislação juntamente com a padronização e harmonização dos métodos de análise, a fim de se evitar resultados que, por si só, não podem ser comparados devido às diferenças no limite de detecção e quantificação.

Em países da União Européia, no caso em que um material GM seja comprovadamente de origem adventícia e represente apenas uma pequena porção do ingrediente considerado, as regras de rotulagem não são aplicáveis a este ingrediente (CR, 2000).

Em novembro de 2002, o Conselho Europeu determinou um limiar (*threshold*) de 0,5% para alguns eventos GM não autorizados de fonte adventícia, cujo risco foi avaliado e favorável à sua aceitação (EC, 2003b; EC, 2004). Atualmente para a maioria dos países a tolerância para a detecção de eventos não autorizados é um *threshold* igual a “zero”. Na União Européia, as novas propostas para a determinação de um *threshold* para a presença adventícia de material-GM não autorizado têm recebido uma avaliação favorável pelas autoridades regulamentárias. Admite-se que uma quantificação igual a “zero” é virtualmente impossível de ser atingida, seja pelas considerações ambientais e mecânicas, sejam pelas limitações dos métodos disponíveis de detecção e quantificação de OGMs (VANDERGRIFT e GOULD, 2003).

A Comissão Européia também sugeriu em 2001 revisões nas diretivas européias de comércio de sementes, levando em consideração que a segregação total de sementes é impossível, e determinando um limite de 0,3% para presença adventícia de material GM em culturas com polinização cruzada e 0,5% para culturas com auto-polinização, como a batata (EC,2001).

Nos Estados Unidos, não há regulamentações federais a cerca das culturas GM e a jurisdição é dividida entre a Food and Drug Administration (FDA), the Environmental Protection Agency (EPA) e a United States Department of Agriculture (USDA). Para estes órgãos, considera-se a inexistência de riscos para saúde ou ambientais das culturas GM. Desta forma, não há uma política nacional nos EUA sobre a presença adventícia de sementes GM para as variedades autorizadas e para as não autorizadas. Para estas últimas, a tolerância é “zero” por

falta de determinação de um limiar de aceitação (VANDERGRIFT e GOULD, 2003), de forma similar ao que ocorre no Brasil.

Com o advento de novas culturas-GM como batata, tomate, arroz, trigo, cana-de-açúcar, feijão, beterraba, frutas diversas e outros alimentos, somando-se com a complexidade das matérias-primas utilizadas em produtos terminados, uma proposta de controle por indústrias e órgãos de fiscalização é a adoção de métodos por *screening* para análise simultânea de várias variedades de modificação genética numa mesma plataforma. Vários estudos têm sido conduzidos com novas estratégias de detecção em resposta ao crescente desenvolvimento e aprovações de culturas GM no mundo (QUERCI et al., 2010).

Segundo VANDERGRIFT e GOULD, a presença adventícia implica que a ocorrência de material GM é acidental e inevitável (2003), mesmo quando medidas para contenção da contaminação de sementes são adotadas, durante a produção e processamento dos grãos. No entanto os autores avaliam a questão sob o ponto de vista jurídico. A dificuldade em se controlar a cadeia produtiva para impedimento da presença adventícia de culturas torna a aplicação do limiar de 1% uma tarefa árdua para produtores, fabricantes e exportadores de grãos e cereais e é desafiado pela existência de métodos cada vez mais sensíveis e o surgimento de novas variedades GM.

5.3 Amostragem

Diferentes protocolos de amostragem estão disponíveis atualmente para análise de OGMs. Na Europa, duas referências são amplamente adotadas pelas indústrias de alimentos, visando o monitoramento quanto a este parâmetro. No Brasil, não há uma instrução oficial sobre coleta das amostras para este fim.

Devido à grande heterogeneidade do lote de matérias-primas e produtos terminados, é preciso contrabalancear a alocação de custos de coleta e análise de OGMs para um determinado número de amostras e a confiabilidade e representatividade do resultado.

Os resultados demonstram que o plano atual representa um grande descarte de amostras, que devido a diversos fatores, tais como alteração na receita de fabricação do produto, risco de contaminação microbiológica, perda de rastreabilidade do processo, transporte e outros, não permitem o reaproveitamento para remanufatura dos produtos na linha de produção. Além desses anteriores, deve-se mencionar o dano ambiental de descarte e destruição de produtos e matérias-primas em quantidades elevadas.

Para o produto embalado pronto para consumo, verificou-se uma variação entre as replicatas coletadas a cada intervalo de tempo; no entanto, a amostra global, anteriormente analisada foi estatisticamente representativa, com um grau de confiança de 95% das replicatas, demonstrando que, neste caso, a análise individual das amostras elementares não seria necessária. Nestes casos a coleta de um número maior de amostras intermediárias nos intervalos de produção, além das dez unidades coletadas também poderia ser poupada. Sendo assim, recursos analíticos poderiam ser minimizados para avaliação destes lotes.

A bebida UHT à base de soja é uma amostra líquida, de fácil e natural homogeneização durante o processo de fabricação. Para outras matrizes, este resultado pode variar conforme a composição e tipo de processamento.

Uma das interpretações em relação à legislação atual para rotulagem de produtos quanto à presença de OGMs considera o processo de fabricação e não a composição do produto final, pronto para consumo. Nesta abordagem, duas situações podem estar presentes no monitoramento de OGMs na cadeia produtiva de alimentos:

- 1) a quantidade e a complexidade de ingredientes que compõem os produtos alimentícios manufaturados impossibilitam a análise de todas as constituintes, visto que, não somente matérias-primas derivadas de soja ou milho possam apresentar material GM;
- 2) as análises de fiscalização são focadas na investigação do produto terminado.

Desta forma, torna-se interessante uma proposta de monitoramento de checagem cruzada da cadeia produtiva de alimentos. Nesta proposta, (a) uma avaliação inicial da maioria das matérias-primas cujo DNA permanece minimamente

íntegro para análise por PCR, evidenciará quais delas possuem maiores incidências de milho ou soja GM ou presença adventícia de milho ou soja GM (e futuramente outras culturas); (b) uma frequência pode ser estabelecida para análise dessas matérias-primas como ferramenta de monitoramento, rastreabilidade e conformidade à legislação; (c) ao mesmo tempo que o produto final empacotado pode ser analisado, já que um resultado de detecção ou quantificação de OGMs de uma amostra no final da cadeia de produção pode evidenciar algum ingrediente fora de especificação incluso ou não no monitoramento.

5.4 Quantificação relativa e eventos piramidados

O limiar de 1% no Brasil e 0,9% nos países da União Européia foi determinado de forma a tolerar a presença de material GM não intencional, visto que a garantia de um lote de matéria-prima livre de OGMs torna-se a cada dia mais difícil com o crescente aumento da adoção, cultivo e comercialização de variedades GM.

Uma das dificuldades na adoção de técnicas de quantificação relativa baseadas na utilização de materiais de referência certificados é a própria disponibilidade destes materiais. Apenas na Europa a legislação obriga o mercado a disponibilizar materiais de referência e informações sobre a modificação genética juntamente com a comercialização da variedade GM (EC, 2003) que permitem o desenho de *primers* e sondas para os ensaios.

Como visto anteriormente, a presença adventícia de culturas também dificulta o monitoramento dos OGMs e cumprimento das regras para não-rotulagem dos produtos, pois a presença não intencional de traços de uma variedade GM pode representar uma quantificação relativa percentualmente acima de 1% ou 0,9%. Atualmente com a grande adoção e desenvolvimento das técnicas de análise de ácidos nucleicos, as metodologias se tornaram altamente sensíveis, permitindo a quantificação com certo grau de exatidão de ocorrências de material GM em pequenas quantidades (Figura 11).

A quantificação de OGMs também deve ser discutida com relação aos eventos piramidados, uma nova geração de variedades GMs que englobam duas ou mais modificações em uma mesma planta. No Brasil, uma variedade de soja GM e 6 variedades de milho GM piramidados possuem aprovação pela CTNBio (MAPA, 2011).

Para países que optaram por adotar um enfoque no produto e não no processo, com relação às políticas de rotulagem de OGMs, os fatores anteriormente mencionados relacionam-se com o posicionamento de órgãos de regulamentação e o próprio mercado consumidor.

O enfoque de quantificação de DNA-GM/DNA-total em porcentagem e por evento é a abordagem adotada pela União Européia, e exclui casos de ocorrência de contaminação não intencional por material GM em matérias-primas, e é independente da composição ou receita do produto final.

Uma das interpretações sobre a ocorrência de material GM é a proporção em peso no produto final. Como visto anteriormente, algumas matérias-primas como maltodextrina, xarope de glicose e outros estão sofrerem um grau de processamento, cuja detecção e quantificação por métodos de análise de ácidos nucléicos não podem ser realizados por total degradação dos mesmos. Neste caso, o objetivo de informar o consumidor sobre a origem da matéria-prima não pode ser cumprido, exceto se o processo for monitorado e rastreado quanto à presença de OGMs.

Para agências de fiscalização, a falta de informações sobre a composição do produto pode dificultar a interpretação do resultado, que pode, neste caso, contabilizar a ocorrência de OGMs de origem adventícia em matérias-primas ou mesmo a existência de variedades piramidadas, para as quais o cálculo de conversão DNA-GM/DNA-total para massa-GM/massa-total se torna extremamente complexo.

5.5 Considerações finais

O presente estudo buscou avaliar os processos de produção de alimentos em escala industrial, nos aspectos da degradação de DNA decorrente de variados tipos de processamento, a presença adventícia de variadas culturas GM e não-GM e a amostragem, com o objetivo do monitoramento de OGMs e cumprimento da legislação acerca da produção e rotulagem.

Algumas matrizes de alimentos apresentam degradação total do DNA e não são passíveis de análise para presença de OGMs pela técnica de PCR em tempo real. Outras possuem uma degradação parcial, na qual o DNA não é detectado na por espectrofotometria, mas ainda apresenta fragmentos para amplificação por PCR, considerando a escolha de *amplicons* de pequeno tamanho (<130bp).

Os grãos possuem presença adventícia de culturas diferentes da principal, e esta presença compreende materiais-GM em metade dos casos de amostras compostas por soja ou milho, e em todas as amostras compostas por trigo. Devido às baixas concentrações de soja ou milho, a quantificação relativa do evento de modificação genética de origem adventícia pode facilmente ultrapassar o limite de 1%, dificultando o atendimento à legislação. Esta presença adventícia deve ser levada em consideração quando da obrigatoriedade de rotulagem especial, uma vez que é difícil de ser controlada na cadeia produtiva dos alimentos.

Em relação à amostragem, a alocação de recursos e tomada de amostras devem ser equilibrados de forma a evitar o desperdício e garantir a confiabilidade dos resultados. Embora não existam protocolos oficiais no país para análise de OGMs, a metodologia utilizada para amostragem de matérias-primas mostrou-se adequada para a obtenção dos resultados, embora dela decorra um grande desperdício de material excedente da amostragem, o que acarreta uma carga ambiental extra. Para produtos terminados já embalados, pelo contrário, não pode ser aplicado o mesmo procedimento e a alternativa de coleta de menor quantidade de amostras mostrou-se suficiente para a formação de uma amostra global representativa, no caso do modelo adotado.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e discutidos anteriormente sobre a avaliação de metodologia de detecção e quantificação por PCR em tempo real em alimentos, podemos concluir que:

1. O processamento industrial pode destruir parcialmente ou totalmente o DNA das matrizes alimentares, razão pela qual a reação de detecção de OGMs por PCR em tempo real foi diretamente afetada pelo estado de conservação da molécula.
2. Produtos alimentares cujo DNA encontra-se totalmente degradado só podem ser atestados quanto à sua origem de OGMs ou não através de rastreabilidade do processo.
3. A presença adventícia de grãos GM em produções não-GM deve ser monitorada durante a certificação de produtos não-GM, pois a presença adventícia de grãos GM pode ser originária de culturas não utilizadas intencionalmente nos ingredientes.
4. A legislação para OGMs no Brasil não menciona sobre a interpretação de resultados de quantificação de OGMs em casos de presença adventícia, tornando controversos os casos de rotulagem especial obrigatória.
5. É necessária a padronização de metodologias de detecção e quantificação de OGMs com limites de detecção e quantificação semelhantes e comparáveis.
6. O plano de coleta e amostragem para matérias-primas CEN/TS 15568 foi aplicado apresentando grande desperdício de material.
7. O plano de coleta e amostragem para produtos terminados foi estatisticamente representativo do lote e pode ser uma alternativa para o monitoramento de OGMs por indústrias do setor alimentício.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANGE (Associação Brasileira de Produtores de Grãos Não Geneticamente Modificados). OGMfree – o sucesso da velha soja convencional. Disponível em: http://www.abrange.org/informa/informa_br_nota.asp?cod=114. Acesso em 21 de abril de 2011.
- AHMEDF.E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnol.**, v.20, n.5, p. 215-223, 2002.
- ANDRADE P. P.; NEPOMUCENO A. L.; VIEIRA M. L. C.; BARROSO P. A. V.; TAPIAS B. A.; COLLI W.; PAIVA E. Milho geneticamente modificado. Bases científicas das normas de coexistência entre cultivares. Ministério de Ciência e Tecnologia, 2009, 53p.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Quantifiler kits. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/7j2orxf7.pdf>. Acesso em 13 de maio de 2011.
- BECHTEL D. B.; JULIANO B. O. Formation of protein bodies in the starchy endosperm of rice (*Oryza sativa* L.): a re-investigation. **Annals of Botany**; v. 45, p.503-509, 1980.
- BERG P.; BALTIMORE D.; BOYER H. W.; COHEN S. N.; DAVIS R. W.; HOGNESS D. S.; NATHANS D.; ROBLIN R.; WATSON J. D.; WEISSMAN S.; ZINDER N. D. Biohazards of recombinant DNA. **Science**, v. 185, p. 3034, 1974.
- BERTHEAU Y et al. Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. **Journal of AOAC International.**, v.85, p.801-808, 2002.
- BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24.04.2003. Regulamento o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de abril de 2003. Seção 1, p. 2.
- BROLL H.; ZAGON A.; GROHMANN L. GVO Analytik: Validierung und Ringversuche. OGManalytik heute. In: SYMPOSIUM ORGANIZED BY SCIL DIAGNOSTICS GMBH AND GENESCAN EUROPE AG., Frankfurt am Main, 23 de janeiro de 2002.
- CANKAR K.; RAVNIKAR M.; ZEL J.; GRUDEN K.; TOPLAR N. Real-time polymerase chain reaction detection of Cauliflower mosaic virus to complement the 35S screening assay for genetically modified organisms. **J AOAC Int.**, v. 88, n. 3, p. 814-822, 2005.
- CHEN Y.; GE Y.; WANG Y. Effect of critical processing procedures on transgenic components in quality and quantity level during soymilk processing of

- Roundup Ready Soybean. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 1, 2007.
- CHEN Y.; WANG Y.; GE Y.; XU B. Degradation of endogenous and exogenous genes of roundup-ready soybean during food processing. **J Agric FoodChem.**, v. 53, n. 26, p. 10239-10243, 2005.
- COCKBURN A. Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach. **J Biotechnol.**, v. 98, n. 1, p.79-106, 2002.
- COHEN S. N., CHANG A. C., BOYER H. W., HELLING R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 70, p. 3240-3244, 1973.
- CONCEIÇÃO F., MOREIRA A., BINSFELD P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, v.36, n. 1, 2006.
- CONTRI D. **Detecção de resíduos de DNA em alimentos: Avaliação da qualidade, da quantidade e da capacidade de amplificação por PCR de DNA extraído de matérias-primas e produtos acabados para fins de análise de transgenia**. 2006. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- CORBISIER P.; TRAPMANN S.; GANEBERG D.; HANNES L.; IWAARDEN P. VAN; BERBEN G. et al. Quantitative determination of roundup ready soybean (*Glycine max*) extracted from highly processed flour. **Anal Bioanal Chem.**, v. 383, n. 2, p. 282-290, 2005.
- CR. Commission Recommendation of 10 January 2000 amending Council Regulation (EC) No 1139/98 concerning the compulsory indication on the labeling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particular other than those provide for in Directive 79/112/EEC. **Official Journal of the European Union**. 10 de janeiro de 2000.L 6, p.13-14.
- CR.Commission Recommendation of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and materials produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No1830/2003. **Official Journal of the European Union**. 04 de outubro de 2004.L348, p.18.
- CTNBio.Comissão Técnica de Biossegurança. Aprovações Comerciais. Disponível em <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12786.html>. Acesso em 22 de janeiro de 2012.
- DEBODE F., JANSSEN E., BERBEN G. Physical degradation of genomic DNA of soybean flours does not impair relative quantification of its transgenic content. **European Food Research and Technology**, v. 226, n.1, 2007.
- DLUGOSCH K. M., WHITTON J.J. **Mol Ecol.**, v. 17, p.1167-1169, 2008.

- EC. Regulation (EC) N° 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22nd September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. **Official Journal of the European Union**. 22 de setembro de 2003. L. 268, p.1-28.
- EC.Regulation (EC) N° 1829/2003.List of the genetically modified material which has benefited from a favorable risk evaluation within the meaning of Article 47 of Regulation (EC) No. 1829/2003.**Official Journal of the European Union**.2003b.
- EC.Regulation (EC) n° 641/2004. of the European Parliament and of the Council of 6th April 2004 on detailed rules for the implementation of Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the application for the authorisation of new genetically modified food and feed, the notification of existing products and adventitious or technically unavoidable presence of genetically modified material which has benefited from a favourable risk evaluation. **Official Journal of the European Union**. 6 de abril de 2004.L.102, p.14-25.
- ENDRES A.; BRYAN J. Revising Seed Purity Laws to Account for the Adventitious Presence of Genetically Modified Varieties: A First Step towards Coexistence. **J. Food L. & Pol'y**., v.144, p. 131-164, 2005.
- ENGEL K. H.; MOREANO F.; EHLERT A.; BUSCH U.Quantification of DNA from genetically modified organisms in composite and processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 9, p.490-497, 2006.
- FDA (Food and Drug Administration).Guidance for industry voluntary labeling indicating whether foods have or have not been developed using bioengineering.2001.
- FEINBERG M.; FERNANDEZ S.; CASSARD S.; CHARLES-DELOBEL C. Quantification of the 35S promoter in maize DNA extracts from genetically modified organisms using real-time polymerase chain reaction: Part 2: interlaboratory study. **J AOAC Int**, v. 88, n.2, p. 558-573, 2005.
- FERNANDEZ S.; CHARLES-DELOBEL C.; GELDREICH A.; BERTHIER G.; BOYER F.; COLLONIER C. et al. Quantification of the 35S promoter in DNA extracts from genetically modified organisms using real-time polymerase chain reaction and specificity assessment on various genetically modified organisms: Part 1: Operating procedure. **J AOAC Int.**, v. 88, n.2, p. 547-557, 2005.
- FERREIRA R. T. B; BRANQUINHO M. R.; CARDARELLI-LEITE, P. Soja geneticamente modificada em alimentos contendo farinha e preparados à base de farinha de trigo. Detecção e adequação à legislação de rotulagem. **Braz. J. Food Technol.**, v. 12, n. 3, p. 241-248, 2009.

- GAMBOA, D. A. L. et al. Caracterización molecular y biológica de genes recombinantes en maíz criollo de Oaxaca. **Agric. Téc. Méx.**, v. 32, n.3, p. 267-279, 2006.
- del GAUDIO S.; CIRILLI A.; di BERNARDO G.; GALDERISI U.; CIPOLLARO M. A preamplification approach to GMO detection in processed foods. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, p. 2135-2142, 2010.
- GIOVANNINI T.; CONCILLO L. PCR detection of genetically modified organisms: a review. **Starch**, v. 54, p.321-327, 2002.
- GRYSON N.; DEWETTINCK K.; MESSENS K. Detection of Genetically Modified Soy in Doughs and Cookies. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 109-115, 2007.
- GRYSON N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based OGM analysis: a review. **Anal. Bioan. Chem.**, v. 396, n. 6, p. 2003-2022, 2009.
- HERNANDEZ M.; DUPLAN M. N.; BERTHIER G.; VAITILINGOM M.; HAUSER W.; FREYER R.; PLA M.; BERTHEAU Y. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 4632–4637, 2004b.
- HOLST-JENSEN A.; RONNING S. B.; LOVSETH A.; BERDAL K. G. **Anal Bioanal Chem.**, v. 375, p. 985-993, 2003.
- HUPFER C.; HOTZEL H.; SACHSE K.; MOREANO F.; ENGEL K. H. PCR-based quantification of genetically modified Bt maize: single-competitive versus dual-competitive approach. **European Food Research and Technology**, v. 212, n.1, p-95-99, 2000.
- ISO/DIS. Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction. **European Committee for Standardization** (21571:2005). 2005.
- ISO/DIS. Foodstuffs – methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – quantitative nucleic acid based methods. **European Committee for Standardization** (21570:2005). 2005.
- ISO/DIS. Sampling procedures for inspection by attributes – Part 2: Sampling plans indexed by limiting quality (LQ) for isolated lot inspection **European Committee for Standardization** (2859-2:1985). 1985.
- JAMES C. Report on Global Status of Biotech/GM Crops in 2009. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications -**ISAAA**, Briefs n. 41, 2010.
- JAMES C. Report on Global Status of Biotech/GM Crops in 2010. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications -**ISAAA**, Briefs n. 42, 2011.

- KAKIHARA Y.; MATSUFUJI H.; CHINO M.; TAKEDA M. Extraction and detection of endogenous soybean DNA from fermented foods. **Food Control.**, v. 17, n.10, p. 808-813, 2006.
- KAKIHARA Y.; MATSUFUJI H.; CHINO M.; YAMAGATA K. Detection of recombinant DNA of genetically modified (GM) soybeans in heat-treated GM soybeans and commercial natto. **Food Control.**, v. 18, n. 10, p. 1289-1294, 2008.
- KAY S.; PAOLETTI C. Sampling Strategies for OGM Detection and/or Quantification. Technical note circulated to DG-SANCO, experts at a sampling meeting, 13 Sep 2001, and the European Network of OGM Laboratories plenary meeting, November 2001. Disponível em: http://mbg.jrc.ec.europa.eu/home/documents/EuroReport-Sampling_Strategies.pdf. Acesso em 24 de abril de 2010.
- KEANE R. M.; CRAWLEY M. J. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 17, p. 164-170, 2002.
- KERSHEN D. L.; LAUER M. J. Adventitious presence: Inadvertent commingling and coexistence among farming methods. **CAST** – Council for Agricultural Science and Technology Commentary, Iowa, 2006.
- KLEIN J.; ALTENBUCHNER J.; MATTES R. Nucleic acid and protein elimination during the sugar beet manufacturing process of conventional and transgenic sugarbeets. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 145-153, 1998.
- KLETER G. A.; PRANDINI A.; FILIPPI L.; MARVIN H. J. **Food Chem Toxicol.**, 2008.
- LANDRIGDE P.; FEIX G. A zein gene of maize is transcribed from two widely separated promoter regions. **Cell**, v. 34, n. 3, p 1015-1022, 1983.
- LAFFONT J.; REMUND K. M.; WRIGHT D.; SIMPSON R. D.; GRÉGOIRE S. Testing for adventitious presence of transgenic material in conventional seed or grain lots quantitative laboratory methods: statistical procedures and their implementation. **Seed Science Research**, v. 15, p. 197-204, 2005.
- LATADO R. R.; ZÜGE R. M.; FÉLIX J. C. Programa de Certificação de Grãos e Farelo de soja não-OGM. **Metrologia**, 2003.
- LEASK B. Troubles with thresholds. Canadian seed trade association. Disponível em <http://www.cdnseed.org/pdfs/press/Troubles%20With%20Thresholds.PDF>. Acesso em 22/04/2011.
- MAPA. Plantas geneticamente modificadas autorizadas para produção comercial no Brasil. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/organismos-geneticamente-modificados/plantas-autorizadas>. Acesso em 21/05/2011.
- MAPA. Instrução normativa no. 43 de 1 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 1º de dezembro de 2006. Seção 1, p. 4.

- MARCELINO F. C.; GUIMARÃES M. F. M.; BARROS E. G. Detecção e quantificação de alimentos geneticamente modificados: o panorama brasileiro. **Ceres**, v. 54, n. 313, p. 239-249, 2003.
- MCHUGHEN A. Fatal flaws in agbiotech regulatory policies. **Nat. Biotechnol**, v. 25, p. 725-727, 2007.
- MICHELINI E.; SIMONI P.; CEVENINI L.; MEZZANOTE L.; RODA A. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. **Anal Bioanal Chem**, v. 392, n. 3, p. 355-367, 2008.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA (MCT). Comissão Técnica de Biossegurança. Parecer técnico nº 1.100/2007 – Liberação do Milho Geneticamente Modificado MON810. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 04 de setembro de 2007. Seção 1, p. 9.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA (MCT). Comissão Técnica de Biossegurança. 2007. Instrução normativa nº18 - Liberação da Soja Geneticamente Modificada RRS. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 30 de dezembro de 1998. Seção 3, p. 101.
- MIRAGLIA M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food Chemical Toxicology**, v. 42, p.1157-1180, 2004.
- MOREANO F.; BUSCH U.; ENGEL K-H. Distortion of genetically modified organism quantification in processed foods: Influence of particle size compositions and heat-induced DNA degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.9971-9979, 2005a.
- NASSAR A.M. Certificação no agronegócio. Estudo temático apresentado no IX Seminário Internacional PENSA de Agribusiness. Águas de São Pedro. 1999.
- OGAWASA T.; ARAKAWA F.; AKIYAMA H.; GODA Y.; OZEKI Y.. Fragmentation of DNAs of processed foods made from genetically modified soybeans. **Jpn J Food Chem**, v. 10, n. 3, p. 155-160, 2003.
- PADGETTE S. R.; KOLACZ K. H.; DELANNAY X.; RE D. B.; LAVALLEE B. J.; TINIUS C. N.; RHODES W. K.; OTERO Y. I.; BARRY G. F. EICHNHOLTZ D. A.; PESCHKE V. M.; NIDA D. L.; TAYLOR N. B.; Eichholtz, D.A., KISHORE G. M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, v. 35, p.1451–1461, 1995.
- QIAGEN. **QIAquick Spin Handbook**. 2008.
- QUERCI M.; Van den BULCKE M.; ZEL J.; Van den EEDE G.; BROLL H. New approaches in OGM detection. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, p. 1991-2002, 2010.
- RIZZI A.; PANEBIANCO L.; GIACCU D.; SORLINI D.; DAFFONCHIO D. Stability and recovery of maize DNA during food processing. **Italian Journal of Food Science**, v. 15, n. 4, p. 499-510, 2003.

- RODRÍGUEZ-LÁZARO D.; LOMBARD B.; SMITH H.; RZEZUTKA A.; D'AGOSTINO M.; SCHROETER A.; MALOMY B.; MIKO A.; GUERRA B.; DAVISON J.; KOBILINSKY A.; HERNÁNDEZ M.; BERTHEAU Y.; COOK N. **Trends Food Sci Tech**, v. 18, p 306-319, 2006.
- RÜHL G. Possible ways of adventitious GM presence from seed production to processing. **Seminar on cross contamination**. Tallinn. 2007
- HARI K.; SHRESTHA K.; HWU K.-K.; WANG S.-J.; LIU L.-F.; CHANG M.-C. Simultaneous Detection of Eight Genetically Modified Maize Lines Using a Combination of Event- and Construct-Specific Multiplex-PCR Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 8962-8968, 2008.
- SPIEGELHALTER F.; LAUTER F. R.; RUSSELL J M. Detection of genetically modified food products in a commercial laboratory. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 634-640, 2001.
- TAVENIERS I.; Van BOCKSTAELE E.; de LOOSE M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling OGMs: different real-time duplex quantitative PCR methods. **Anal Bioanal Chem**, v. 378, n. 5, p. 1198-1207, 2004.
- TEARE J. M.; ISLAM R.; FLANAGAN R.; GALLAGHER S.; DAVIES M. G.; GRABAU C. Measurement of Nucleic Acid Concentrations using the DyNA Quant™ and the GeneQuant™. **BioTechniques**, v. 22, p1170-1174, 1997.
- PESKE S. T.; TILLMAN M. A. A. Limites de tolerancia para sementes adventícias. **Seed News**, n. 5, 2009.
- TOZZINO A. C. Detección de OGMs en la Cadena Agroalimentaria. In: Echenique V. et al. Biotecnología y mejoramiento vegetal, p.409-424, 2004.
- TRAPMANN S.; EMONS H. Reliable OGM analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.381, p.72-74, 2005.
- 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 Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p 5261-5266, 1999.
- VANDERGRIFT S.; GOULD C. Issues Surrounding the International Regulation of Adventitious Presence and Biotechnology. **Jurimetrics**, v. 44, p. 81-98, 2003.
- VIJAYAKUMAR K. R.; MARTIN A.; GOWDA L. R.; PRAKASH V. Detection of genetically modified soya and maize: Impact of heat processing. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 514-521, 2009.
- VODKIN L. O.; RHODES P. R.; GOLBERG. R. B. Lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. **Cell**, v. 34, n. 3, p. 1023-1031, 1983.

- WEIGHARDT F.; BARBATI C.; PAOLETTI C.; QUERCI M.; KAY S.; de BEUCKELEER M et al. Real-time PCR based approach for quantification of the pat gene in the T25 Zea Mays event. **J AOAC Int**, v. 87, n. 6, p. 1342-1355, 2004.
- WISEMAN G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 3, p. 792-796, 2009.
- YAMAGUCHI et al. Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan. **Food Control**, v.14, p.201-206, 2003.
- YOSHIMURA T.; KURIBARA H.; KODAMA T.; YAMATA T.; FUTO S.; WATANABE S. Comparative studies of the quantification of genetically modified organisms in foods processed from maize and soy using real time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2060-2069, 2005.

8 APÊNDICES

APÊNDICE – A. Composição das amostras testadas.

Amostra	Composição
Amido de arroz	Arroz
Amido de batata	Batata
Amido de mandioca	Mandioca
Amido de milho	Milho
Arroz em grão	Arroz
Barra de cereal ¹	Aveia, flocos de arroz, trigo e cevada, xarope de glicose, frutas, açúcar invertido, gordura de palma, lecitina de soja, estabilizantes, acidulantes, aromatizantes, glúten
Bebida UHT à base de soja de variados sabores ¹	Água, açúcar, proteína isolada ou extrato de soja, polpa de frutas, sal, acidulantes, estabilizantes, emulsificantes, espessantes, aromatizantes
Bebida UHT à base de soja sabor "Original" ¹	Água, açúcar, proteína isolada ou extrato de soja, sal, acidulantes, estabilizantes, emulsificantes, espessantes, aromatizantes
Biscoito de variados sabores ¹	Farinha de trigo enriquecida, xarope de açúcar, extrato de malte, gordura vegetal, açúcar, amido, sal, fermentos, lecitina de soja, aromatizantes, emulsificantes, corantes
Cereal infantil de variados sabores ¹	Farinha de arroz, trigo ou milho, amido, sais minerais, vitaminas, glúten
Cereal matinal de variados sabores ¹	Milho, arroz, açúcar, farelo de trigo, sal, extrato de malte, sais minerais, vitaminas, xarope de glicose, estabilizantes, glúten
Dextrose de milho	Milho
Farelo de trigo	Trigo
Farinha de arroz	Arroz
Farinha de aveia	Aveia
Farinha de centeio	Centeio
Farinha de cevada	Cevada
Farinha de milho	Milho
Farinha de trigo	Trigo
Fibra de milho	Milho
Gordura vegetal	Óleos vegetais de diversas fontes
Grão de milho integral	Milho
Gritz de milho	Milho
Lecitina de soja	Soja
Leite em pó	Leite, vitaminas
Maltodextrina	Milho
Mix de cereais	Aveia, flocos de arroz, trigo e cevada
Proteína isolada de soja	Soja
Semolina de milho	Milho
Trigo vermelho em grão	Trigo
Xarope de glicose de milho	Milho

¹ Para amostras de produtos terminados advindos de vários fabricantes, foram considerados os ingredientes comuns ou em maior proporção na composição final.

APÊNDICE - B. Valores de CTs para cada duplicata analisada por PCR em tempo real para os genes-alvo lectina, zeína, prolamina, WpepCi1, p-35S, t-NOS, CP4EPSPS, hsp-cry1Ab e CTP4.

Descrição do material	Lectina	Zeína	Prolamina	WpepCi1	p-35S	t-NOS	CP4 EPSPS	hsp-cry1Ab	CTP4
Amido de Arroz	-	-	12,10	-	-	-	30,24	-	-
Amido de Arroz	30,50	18,13	28,96	30,84	-	-	-	25,03	32,34
Amido de Batata	-	-	20,79	28,36	29,51	-	-	-	-
Amido de Mandioca	32,55	26,61	-	-	-	-	-	-	-
Amido de Mandioca	30,46	24,57	29,15	-	-	31,61	31,82	-	-
Amido de Milho	26,84	14,61	-	30,99	16,85	22,95	30,04	17,98	29,39
Amido de Milho	26,33	13,38	-	28,41	23,37	26,92	27,82	24,38	27,25
Amido de Milho	24,88	13,72	26,68	-	22,91	25,60	27,00	24,63	26,09
Amido de Milho	25,64	13,49	-	27,12	22,09	25,86	27,32	23,10	27,15
Amido de Milho	24,10	13,04	29,27	31,13	22,18	25,27	25,91	23,53	25,91
Amido de Milho	26,54	15,02	-	-	23,80	27,35	28,81	25,60	29,33
Amido de Milho	-	-	12,43	-	-	-	30,39	-	-
Amido de Milho	27,87	16,73	28,25	-	28,60	30,06	29,72	-	29,63
Amido de Milho	27,02	14,67	-	29,44	24,76	28,08	29,60	26,19	28,78
Amido de Milho	-	23,41	24,94	-	30,05	31,46	32,22	-	31,61
Amido de Milho	-	22,60	26,17	-	-	-	-	-	-
Amido de Milho	24,28	13,54	30,17	30,49	22,48	25,57	26,12	23,84	25,84
Amido de Milho	26,32	14,48	-	-	23,96	28,10	28,74	25,45	28,30
Arroz em grãos	-	-	12,90	-	29,93	-	-	-	-
Arroz em grãos	-	-	13,03	-	-	-	-	-	-
Arroz em grãos	-	-	7,64	-	32,04	-	-	-	33,27
Arroz em grãos	-	-	13,29	-	-	-	32,02	26,56	34,49
Barra Cereal	24,28	26,13	25,44	18,00	23,04	24,95	25,32	29,80	25,80
Barra Cereal	24,50	29,26	28,61	19,32	23,63	24,90	25,85	30,43	25,86
Bebida UHT à base de soja ("original")	13,02	31,94	-	-	25,93	27,66	-	-	-
Bebida UHT à base de soja ("original")	13,12	31,85	-	-	30,47	30,52	-	-	-
Bebida UHT à base de soja ("original")	13,36	26,90	29,95	-	21,87	23,72	23,40	30,42	23,70
Bebida UHT à base de soja ("original")	13,16	27,81	-	31,66	21,35	22,90	22,91	30,20	23,03
Bebida UHT à base de soja (diversos sabores)	12,63	28,37	-	-	25,62	27,54	29,79	-	-
Bebida UHT à base de soja (diversos sabores)	23,28	-	-	-	-	31,24	-	-	32,17
Bebida UHT à base de soja (diversos sabores)	24,49	-	-	-	-	-	-	-	31,30
Biscoito de variados sabores	27,69	26,63	31,05	18,22	27,09	29,01	29,29	-	29,96
Biscoito de variados sabores	26,87	25,86	-	18,21	26,59	27,65	28,44	26,35	28,87
Biscoito de variados sabores	25,41	28,04	28,24	18,55	24,64	26,21	27,09	21,91	26,84

(continua)

Descrição do material	Lectina	Zeína	Prolamina	WpepCi1	p-35S	t-NOS	CP4 EPSPS	hsp-cry1Ab	CTP4
Biscoito de variados sabores	24,90	26,14	29,43	18,35	24,44	25,92	26,95	30,43	26,68
Cereal infantil à base de arroz	-	22,34	9,44	23,83	29,95	32,41	30,63	-	-
Cereal infantil à base de arroz	16,19	32,08	-	-	-	-	-	-	-
Cereal infantil à base de arroz	16,19	34,40	-	-	-	-	-	-	-
Cereal infantil à base de arroz	18,69	-	-	-	-	-	-	-	-
Cereal infantil à base de arroz	-	-	11,33	-	-	-	-	-	-
Cereal infantil à base de arroz e aveia	29,10	24,55	11,98	25,27	29,74	33,46	31,96	25,36	30,17
Cereal infantil à base de arroz e aveia	30,04	25,53	10,87	23,78	29,59	30,64	32,88	-	30,64
Cereal infantil à base de arroz e aveia	30,66	25,99	10,61	23,96	-	-	33,90	-	-
Cereal infantil à base de cereais variados	27,51	17,51	14,95	18,39	28,60	28,84	30,03	31,75	29,07
Cereal infantil à base de cereais variados	20,83	30,64	29,98	-	32,81	-	-	-	-
Cereal infantil à base de cereais variados	20,49	31,12	28,82	-	31,88	-	-	-	-
Cereal infantil à base de milho	24,10	13,79	17,53	24,27	23,68	26,07	26,39	25,93	26,34
Cereal infantil à base de milho	22,50	31,61	25,78	-	-	-	-	-	-
Cereal infantil à base de milho	22,65	29,24	26,17	-	29,63	-	-	-	-
Cereal matinal à base de arroz	-	-	19,24	-	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	-	20,94	32,21	31,62	29,44	-	-	29,63	31,49
Cereal matinal à base de milho	-	22,77	28,47	-	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	31,10	19,00	28,01	-	33,52	32,74	31,69	-	-
Cereal matinal à base de milho	-	29,84	25,41	-	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	29,21	16,81	25,21	22,00	30,18	30,19	33,44	29,18	31,47
Cereal matinal à base de milho	27,51	16,22	23,03	21,02	27,40	29,06	28,32	29,56	28,61
Cereal matinal à base de milho	30,91	18,62	33,42	25,70	34,43	30,13	35,64	33,21	31,74
Cereal matinal à base de milho	32,09	20,52	29,09	25,05	29,53	-	34,04	-	31,47
Cereal matinal à base de milho	-	26,98	21,36	30,43	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	-	21,20	26,17	-	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	32,63	21,07	25,37	-	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	28,76	14,78	-	-	26,22	31,57	31,38	27,43	32,48
Cereal matinal à base de milho	28,67	15,76	28,29	-	28,03	30,52	31,47	27,39	-
Cereal matinal à base de milho	30,42	16,35	29,57	-	27,44	30,80	35,05	29,56	30,42
Cereal matinal à base	30,00	27,16	21,07	30,87	-	-	-	-	-

(continua)

Descrição do material	Lectina	Zeína	Prolamina	WpepCi1	p-35S	t-NOS	CP4 EPSPS	hsp-cry1Ab	CTP4
de milho									
Cereal matinal à base de milho	-	23,69	28,46	30,43	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	-	28,54	22,66	29,40	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	-	22,28	-	36,38	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	-	23,07	34,07	-	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	31,52	21,74	26,15	32,07	-	-	-	-	-
Cereal matinal à base de milho	-	-	25,94	-	-	-	-	-	-
Dextrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrose	-	-	29,22	-	-	-	-	-	-
Dextrose	30,57	-	30,29	-	-	-	-	-	-
Farelo de trigo	26,67	32,50	31,78	16,97	26,86	30,08	28,56	-	30,08
Farinha de arroz	35,99	-	12,82	-	-	-	-	-	-
Farinha de arroz	-	-	13,31	-	29,67	-	-	-	32,64
Farinha de arroz	-	34,78	12,73	-	29,60	-	32,42	-	-
Farinha de arroz	-	-	12,95	-	-	-	-	-	-
Farinha de arroz	-	29,99	12,56	-	-	-	-	-	-
Farinha de arroz	-	31,04	13,09	-	-	-	-	23,31	-
Farinha de arroz	25,35	14,24	23,62	27,10	25,25	28,36	31,32	27,41	31,13
Farinha de aveia	28,66	29,87	34,44	33,63	29,26	30,08	29,86	-	29,99
Farinha de aveia	30,31	-	30,71	28,52	-	31,81	-	-	-
Farinha de aveia	38,14	37,92	25,90	31,88	-	-	-	-	-
Farinha de aveia	-	-	-	31,90	31,74	-	-	30,21	-
Farinha de centeio	-	30,02	28,00	25,43	-	-	-	-	-
Farinha de centeio	-	27,89	27,16	24,36	28,96	29,60	30,63	-	30,60
Farinha de cevada	30,30	-	28,03	28,07	29,58	-	-	-	-
Farinha de cevada	-	-	34,67	27,90	-	-	-	-	-
Farinha de cevada	27,35	13,97	-	-	25,43	28,98	29,34	26,69	29,48
Farinha de cevada	-	-	26,64	30,87	-	32,57	-	-	32,89
Farinha de cevada	31,95	-	26,86	28,21	-	-	-	-	-
Farinha de milho	27,03	13,65	29,39	-	24,41	28,25	29,37	26,43	29,35
Farinha de milho	34,60	13,49	-	-	22,71	29,64	30,51	25,20	31,36
Farinha de milho	-	29,25	29,25	29,23	31,81	30,48	30,63	-	-
Farinha de milho	25,39	13,91	30,09	-	23,47	27,29	27,00	25,45	27,63
Farinha de milho	32,43	-	13,06	-	-	31,38	-	-	-
Farinha de trigo	27,63	33,60	-	17,71	25,98	28,63	28,65	-	29,01
Farinha de trigo	28,22	28,96	-	17,76	27,87	29,94	30,32	29,98	30,24
Farinha de trigo	26,93	28,26	-	17,79	27,10	28,67	28,85	33,14	29,07
Farinha de trigo	27,47	31,18	29,92	17,81	26,64	28,25	28,53	-	28,71
Farinha de trigo	27,58	28,97	-	17,57	28,26	29,81	29,75	-	29,74
Farinha de trigo	25,77	29,46	-	17,54	26,31	28,44	28,09	-	28,16
Farinha de trigo	26,97	28,89	28,41	17,59	26,74	28,50	28,90	-	28,29

(continua)

Descrição do material	Lectina	Zeína	Prolamina	WpepCi1	p-35S	t-NOS	CP4 EPSPS	hsp-cry1Ab	CTP4
Fibra de milho	30,29	15,23	30,16	32,31	28,44	-	-	29,01	-
Fibra de milho	27,31	15,08	30,25	-	25,94	32,09	31,14	26,92	-
Fibra de milho	26,74	14,89	27,26	-	26,15	28,55	29,71	27,84	29,99
Gordura vegetal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gordura vegetal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grão de milho integral	30,54	15,50	29,07	30,36	29,57	30,38	32,23	-	31,18
Grão de milho integral	-	15,36	34,43	-	-	-	31,20	-	-
Grão de milho integral	-	15,42	28,25	28,69	30,51	30,80	35,26	-	-
Grão de milho integral	28,74	14,36	32,99	39,50	27,68	-	29,70	-	30,64
Grão de milho integral	30,51	15,17	28,93	29,19	-	31,95	39,89	22,78	-
Grão de milho integral	29,45	15,46	22,73	-	20,67	31,30	31,47	21,62	32,38
Gritz de milho	28,22	14,18	33,38	28,66	26,40	29,97	30,68	27,74	30,88
Gritz de milho	26,04	14,48	28,76	33,94	25,72	-	-	26,51	-
Gritz de milho	28,40	13,66	23,26	31,32	26,72	28,94	30,75	28,64	29,82
Lecitina de soja	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lecitina de soja	18,81	29,07	-	28,22	28,67	33,72	32,44	30,62	34,91
Lecitina de soja	22,55	-	-	33,07	22,46	23,59	23,61	-	23,63
Lecitina de soja	22,30	28,77	36,95	-	30,63	29,84	30,23	-	30,02
Lecitina de soja	34,30	-	-	-	-	-	-	-	-
Lecitina de soja	19,46	31,40	34,88	-	33,10	31,37	34,26	-	31,63
Lecitina de soja	18,96	28,29	28,01	27,06	27,82	31,16	30,60	-	30,52
Lecitina de soja	20,79	29,67	33,01	30,46	27,80	29,75	29,27	-	29,84
Leite em pó	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leite em pó	-	-	30,39	-	-	-	-	-	-
Leite em pó	-	29,58	-	-	-	-	31,93	-	-
Leite em pó	-	-	34,70	-	-	-	-	-	-
Leite em pó	-	25,76	-	-	-	-	-	-	-
Leite em pó	-	26,50	33,66	-	-	-	-	-	-
Leite em pó	-	30,57	-	-	-	-	-	-	-
Leite em pó	-	-	28,78	-	-	-	37,00	-	-
Leite em pó	39,95	-	-	-	-	-	32,15	-	-
Leite em pó	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leite em pó	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leite em pó	-	29,97	-	-	-	-	31,08	-	-
Leite em pó	-	25,24	-	-	-	-	-	-	-
Maltodextrina	36,24	29,11	-	-	-	-	-	-	-
Maltodextrina	31,42	-	-	-	-	-	-	36,56	-
Maltodextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltodextrina	-	-	28,79	-	29,18	-	-	21,04	-
Maltodextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mix de cereais	26,16	21,17	15,13	23,32	27,63	28,81	28,69	-	32,84
Mix de cereais	28,06	22,04	15,96	20,09	-	31,51	32,27	-	31,67
Mix de cereais	30,02	22,26	15,58	19,83	30,53	31,40	31,42	-	31,71

(continua)

Descrição do material	Lectina	Zeína	Prolamina	WpepCi1	p-35S	t-NOS	CP4 EPSPS	hsp-cry1Ab	CTP4
Proteína isolada de soja	15,76	30,20	-	-	24,57	26,35	26,71	-	26,57
Proteína isolada de soja	18,56	30,14	-	-	28,07	29,13	-	-	-
Proteína isolada de soja	19,51	-	-	-	32,67	29,59	-	-	-
Proteína isolada de soja	18,07	-	-	-	28,10	30,59	30,17	-	30,65
Proteína isolada de soja	15,77	29,67	-	29,55	28,53	27,76	28,76	26,76	28,71
Proteína isolada de soja	18,12	-	-	-	29,95	31,24	32,73	-	31,76
Semolina de milho	29,03	13,95	25,29	-	22,81	31,30	31,20	27,64	31,23
Semolina de milho	25,00	14,25	29,82	31,81	26,26	29,07	30,76	27,02	30,90
Semolina de milho	26,21	13,62	-	-	25,43	29,00	29,31	26,50	29,75
Semolina de milho	27,02	13,06	28,56	30,20	24,55	26,91	-	25,35	-
Semolina de milho	26,78	14,17	26,91	-	27,11	31,46	-	27,55	-
Semolina de milho	-	14,21	26,99	30,77	-	-	-	29,39	-
Trigo vermelho em grão	-	32,27	32,47	17,05	-	-	-	-	-
Trigo vermelho em grão	-	-	38,63	15,83	-	-	-	-	-
Trigo vermelho em grão	-	28,50	28,99	17,30	-	-	-	-	-
Xarope de glicose de milho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xarope de glicose de milho	-	-	30,11	-	-	-	-	-	-
Xarope de glicose de milho	-	29,97	-	-	-	-	35,12	24,93	-
Xarope de glicose de milho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xarope de glicose de milho	28,70	-	-	-	-	-	-	-	-

Os valores correspondem ao valor CT médio da duplicata para cada amostra analisada por PCR em tempo real. As células com "-" representam um valor de CT indeterminado.