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

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

Daniela Gazoto Contri

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. João Roberto O. do Nascimento

São Paulo
2006
Daniela Gazoto Contri

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

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. João Roberto O. do Nascimento
orientador/presidente

José Eduardo Levi

1º. examinador

Beatriz Rosana Cordenunsi

2º. examinador

São Paulo, 16 de Outubro de 2006.

A toda minha família, em especial à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, pela confiança, orientação e paciência.

Ao Laboratório TECAM e em particular à Dra. Janete Walter Moura, pelo incentivo e apoio.

Ao José Eduardo Levi, pelos ensinamentos e pela preciosa amizade.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro ao projeto (Processo 506331/2004-0).

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Delineamento experimental	32
3.2. Materiais	33
3.2.1. Categoria 1	34
3.2.2. Categoria 2	34
3.2.3. Categoria 3	35
3.2.4. Categoria 4	35
3.2.5. Classificação das Matrizes alimentares	36
3.3. Métodos	46
3.3.1. Preparo das amostras	46
3.3.2. Extração de DNA	47
3.3.2.1. CTAB	48
3.3.2.2. Coluna de sílica	48
3.3.3. Análise espectrofotométrica do DNA	49
3.3.4. Amplificação de DNA	49
3.3.5. Eletroforese em gel de agarose	53
3.3.6. PCR em tempo real	53

4.	RESULTADOS	55
4.1.	Leitura espectrofotométrica	55
4.1.1.	Rendimento	55
4.1.2.	Pureza	61
4.2.	Reação de Amplificação de DNA por PCR	63
4.2.1.	Amplificação do gene de referência: reação de triagem	63
4.2.2.	Amplificação do gene de referência com maior quantidade de DNA e maior número de ciclos	74
4.2.3.	Amplificação do gene de referência com menor quantidade de DNA	78
4.3	Reação de Amplificação de DNA por PCR em tempo real	83
5.	DISCUSSÃO	87
5.1.	Alvos de detecção	87
5.2.	Quantificação e capacidade de amplificação de DNA	88
5.3.	Estratégia de amplificação	94
5.4.	PCR em tempo real	96
6.	CONCLUSÕES	99
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8.	ANEXOS	110
	Anexo 1. Descrição das matrizes	110
	Anexo 2. Dados brutos da análises espectrofotométrica	112
	Anexo 3: Valores médios de Ct	113

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade, a quantidade e a capacidade de amplificação por PCR de DNA extraído de grãos de soja e milho, seus derivados e produtos acabados contendo como ingredientes obtidos desses grãos, com vistas à detecção de resíduos de organismos geneticamente modificados em alimentos.

Para a amplificação de DNA pela PCR convencional, não houve melhor adequação de um protocolo de extração. Ambos métodos, CTAB e coluna de sílica tiveram desempenho comparável para as 32 matrizes avaliadas.

A técnica de PCR em tempo real se mostrou mais sensível à qualidade do DNA testado e nesse contexto, o método CTAB se mostrou mais eficiente do que o método de coluna de sílica.

Independentemente do método de extração utilizado não foi possível detectar DNA em óleos de soja e milho e em alguns derivados de amido, sugerindo que a aplicabilidade da lei de rotulagem pode esbarrar num entrave técnico no caso de algumas matrizes alimentares altamente processadas.

Palavra chave: extração, DNA, organismo geneticamente modificado, alimento, PCR, PCR em tempo real.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the quality, the quantity and the amplifiability by PCR of DNA isolated from soybean and maize grains and their by-products targeting the detection of genetically modified organisms in food.

PCR amplification of DNA samples isolated either from CTAB and silica-column extraction methods achieved comparable performances. Both extraction methods showed similar results for the 32 tested matrices.

The DNA amplification by real time PCR appeared to be affected by the quality of the isolated DNA. In this context, the CTAB extraction method showed to be more suitable when compared to the silica-column method.

No DNA was amplified from soy and maize oils, as well as from some starch by-products, regardless the DNA extraction method used. It suggests that, the labeling requirement may rely on technical issues considering some high processed foodstuffs.

Key-words: DNA extraction, DNA, genetically modified organism, food, PCR, real time PCR.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Etapas do processamento industrial da soja	27
Figura 2. Etapas do processamento industrial do milho	32
Figura 3. Rendimento de DNA obtido de matrizes alimentares	46
Figura 4. Razão entre a leitura espectrofotométrica a 260 e 280 nm de amostras de DNA	50
Figura 5. Rendimento, concentração, pureza de DNA e capacidade de amplificação do gene da lectina para amostras da categoria 1	54
Figura 6. Rendimento, concentração, pureza de DNA e capacidade de amplificação do gene da invertase para amostras da categoria 2	56
Figura 7. Rendimento, concentração, pureza de DNA e capacidade de amplificação dos genes da lectina e invertase para amostras da categoria 3	58
Figura 8. Rendimento, concentração, pureza de DNA e capacidade de amplificação do gene da lectina para amostras da categoria 4	60
Figura 9. Rendimento, concentração, pureza de DNA e capacidade de amplificação do gene da invertase para amostras da categoria 4	62
Figura 10. Eletroforese de DNA em gel de agarose da reação de amplificação do gene da lectina para amostras das categorias 1, 3 e 4	64
Figura 11. Eletroforese de DNA em gel de agarose da reação de amplificação do gene da lectina para amostras das categorias 2, 3 e 4	66
Figura 12. Eletroforese de DNA em gel de agarose reação de amplificação do gene da lectina para amostras sem diluição (s.d.) e diluídas	68
Figura 13. Eletroforese de DNA em gel de agarose reação de amplificação do gene da invertase para amostras sem diluição (s.d.) e diluídas	70
Figura 14. Valores de Ct obtido pela amplificação de DNA em tempo real	73

Tabela 1. Descrição de *primers*_____39

Tabela 2. Média do comprimento de DNA isolado de alimentos processados_____41

Tabela 3. Resultados da amplificação do gene da lectina e/ou da invertase_____71

LISTA DE ABREVIATURAS

Ct: *Threshold cycle*

CTAB: Brometo de hexadecil-trimetil-amônio

CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

dATP: Desoxiadenosina trifosfatada

dCTP Desoxicitidina trifosfatada

dGTP: Desoguanidina trifosfatada

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

dTTP: Desotimidina trifosfatada

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EUA: Estados Unidos da América

FDA: *Food and Drug Administration*

GM: Geneticamente modificado

ISAAA: Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agribiotecnologia

KCl: Cloreto de potássio

MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MHLW: *Ministry of Health, Labor and Welfare*

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development*

OGM: Organismo(s) geneticamente modificado(s)

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RNA: Ácido ribonucléico

TAE: Tampão 0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA

Taq: *Thermophilus aquaticus*

TRIS: 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol

UE: União Européia

UV: Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os avanços nas técnicas de manipulação de seqüências genômicas, de transformação de células vegetais com novas construções genéticas, de regeneração de plantas transformadas, assim como os avanços no conhecimento acerca da função de genes resultaram na produção de novas matérias-primas alimentares, nas quais características foram alteradas não pelo melhoramento convencional, mas pela transgenia ou modificação genética.

Uma planta geneticamente modificada é aquela que recebeu artificialmente um gene desejável, o que não seria possível apenas com o melhoramento genético clássico. O gene inserido, conhecido como "transgene" pode vir de outra planta ou mesmo de outra espécie completamente diferente. A transgenia permite, por exemplo, transformar uma planta convencional em outra que seja mais tolerante a herbicidas ou mais adaptados a determinadas condições ambientais, ou ainda, produzir variedades enriquecidas nutricionalmente ou que ajudem os seres humanos no combate a determinadas doenças.

Em 1994 os Estados Unidos (EUA) introduziram nas prateleiras de seus supermercados, o primeiro alimento geneticamente modificado, o tomate "Flavr Savr". Hoje, além dos EUA, países como Canadá, Japão, Brasil, Argentina e a Comunidade Européia, entre outros já aprovaram a produção e/ou a comercialização de alimentos geneticamente modificados. Existe atualmente no mundo, a aprovação para comercialização de cerca de 17 variedades

geneticamente transformadas. Dentro desse grupo, as principais culturas são soja, algodão, canola e milho. Os principais objetivos da transformação genética de sementes são: melhorar a qualidade, a produtividade e as características da planta e desenvolver resistência a pragas. Pelo menos 50% das plantas geneticamente modificadas possuem como nova característica tolerância a algum herbicida e aproximadamente 85% delas possuem ou tolerância a herbicida ou resistência a alguma praga (James, 2004).

O número de culturas geneticamente modificadas vem aumentando expressivamente, assim como o número de países produtores. Dados do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA) indicam que a área global de cultivo de plantas derivadas da biotecnologia aumentou 20%, 13,3 milhões de hectares entre 2003 e 2004. Em 2004 a área global estimada das lavouras geneticamente modificadas (GM) autorizadas foi de 81 milhões de hectares. Estados Unidos, Argentina, Canadá, Brasil, China, Paraguai, Índia, África do Sul, Uruguai, Austrália, Romênia, México, Espanha e Filipinas foram, em ordem de área plantada, os 14 países que em conjunto cultivaram mais de 50 milhões de hectares de lavouras obtidas pela biotecnologia moderna. A área total ocupada pelas quatro principais lavouras transgênicas também fornece uma interessante perspectiva da adoção da biotecnologia vegetal em escala mundial. Em 2004, 56% dos 86 milhões de hectares de soja cultivada no mundo foram GM. Vinte e oito por cento dos 32 milhões de hectares de algodão foram plantados com sementes obtidas pela biotecnologia. A área cultivada com canola transgênica ocupou 19% dos 23 milhões de hectares plantados com esta cultura. Finalmente, dos

140 milhões de hectares de milho cultivados em escala mundial, 14% foram GM. (James, 2004).

A perspectiva de intensificação do uso e produção de novas plantas, inclusive carregando múltiplas alterações genéticas, assim como o cruzamento entre diferentes variedades apontam para um panorama mais complexo no que tange às práticas agrícolas e à produção de alimentos. A redução de custos e aumento da produtividade na agricultura, além dos potenciais benefícios nutricionais para o consumidor são pontos extremamente positivos dessa nova tecnologia (Fernandes-Cornejo & McBride, 2002; Carpenter, 2001).

Contudo, apesar das vantagens agronômicas, a questão da segurança ambiental e, principalmente, a segurança alimentar dos consumidores são os pontos que mais suscitam polêmica e, conseqüentemente, limitam o avanço e disseminação da biotecnologia em vários países, dentre eles o Brasil. Em que pesem as evidências científicas de que os produtos atualmente liberados para comercialização em vários países e autorizados para consumo humano são, de fato, substancialmente equivalentes aos congêneres convencionais, e que existe embasamento científico que ateste sua segurança, esses produtos são tratados por legislações específicas em vários países, principalmente da Europa e Ásia, e também no Brasil. O estabelecimento de regulamentação específica que trate da experimentação, desenvolvimento, plantio comercial e uso dos produtos derivados da biotecnologia visa garantir o acesso a alimentos com qualidade e seguros para a população.

Essa preocupação é justificada pela possibilidade, ainda que remota, de ocorrência de efeitos indesejáveis, tais como alergenicidade da(s) nova(s)

proteína(s) expressa(s), ou aumento nos níveis de alérgenos ou metabólitos secundários tóxicos, naturalmente presentes na planta original (Kleter & Kuiper, 2002). Além disso, existem as restrições éticas e culturais feitas por determinados setores da sociedade a esses alimentos, ou mesmo o temor decorrente do desconhecimento popular acerca de um processo tecnológico relativamente recente e tão poderoso. Assim, o conjunto de preocupações a respeito do impacto dos alimentos derivados da biotecnologia na saúde dos consumidores, sejam elas cientificamente fundamentadas ou não, resulta, atualmente, num acompanhamento atento das questões relativas ao plantio, comercialização e consumo desses alimentos.

A regulação dos organismos geneticamente modificados é baseada hoje em dois princípios fundamentais: o princípio de equivalência substancial, adotado pelos EUA; e o princípio de precaução, adotado pelos países da União Européia (UE). Enquanto os EUA adotaram uma política de “desregulamentação” de produtos transgênicos, a UE criou mecanismos reguladores que restringiram a sua adoção nos últimos cinco anos. O princípio de equivalência substancial se baseia na avaliação da segurança alimentar, considerando que os organismos geneticamente modificados (OGM) quimicamente equivalentes aos organismos obtidos através de técnicas convencionais de melhoramento genético não requerem estudos toxicológicos adicionais. Diferentemente, o princípio da precaução é baseado no gerenciamento do risco e considera, por sua vez, que a adoção de uma nova tecnologia ou produto deve ser adiada enquanto não houver evidências suficientes de sua inocuidade. Dessa forma, a aprovação de plantio e/ou comercialização de OGM em países que adotam o princípio da precaução

dependem da avaliação meticulosa, por parte de agências regulatórias, de um “pacote” de estudos que inclui a caracterização molecular do evento, estudos de equivalência nutricional, toxicidade, nutrição animal, expressão de proteína heteróloga e avaliações agro-ecológicas realizadas ao longo de mais de uma safra da cultura.

A semelhança do modelo europeu e baseado também no princípio da precaução, o Brasil conta com um órgão oficial, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que regulamenta todos os processos envolvendo organismos modificados geneticamente. De acordo com a nova Lei de Biossegurança 11.105, de 24 março de 2005, a CTNBio é órgão responsável em coordenar as atividades que envolvam OGM no país. É de responsabilidade da comissão o estabelecimento de normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de organismos geneticamente modificados e seus derivados (Brasil, 2005).

Uma vez que cada processo de desenvolvimento de uma matéria-prima alimentar geneticamente modificada resulta num produto único, e que podem ocorrer efeitos ou alterações não-intencionais, a avaliação da segurança desses alimentos é feita caso a caso.

A “ciência regulatória” , como é chamada a etapa de realização de estudos de segurança ambiental e alimentar que compõem um dossiê de registro de um organismo geneticamente modificado, pode levar em torno de

cinco anos para ser concluída. Já o processo completo, desde a transformação da espécie vegetal, seleção das células que incorporaram com sucesso o gene de interesse, identificação do evento “elite” (planta que apresenta ótima expressão do gene de interesse e conseqüentemente da característica desejada) até a submissão e aprovação do dossiê de registro, pode ser de até anos.

Não obstante a todo o criterioso processo de estudos de segurança alimentar e ambiental ao qual os alimentos geneticamente modificados são submetidos e ao processo de regulamentação que deve ser obedecido até a aprovação de um evento derivado de biotecnologia, a rotulagem de OGM, é hoje requerida em diferentes países. Apesar de não se tratar de uma questão de segurança alimentar, por não existir relação entre a quantidade de alimento geneticamente modificado com o risco à saúde, a rotulagem é vista como um direito do consumidor à informação, para que ele possa escolher de acordo com suas preferências.

Desde 1990, o *Codex Alimentarius* tem tentado desenvolver regras para a rotulagem de alimentos derivados de biotecnologia. Contudo, até o momento, não há acordo a respeito de padrões internacionais e as abordagens de diferentes países a cerca da rotulagem de alimentos transgênicos diferem enormemente. A comunidade européia tem regras bastante rigorosas quanto a essa questão. Em contrapartida os Estados Unidos, seguindo seu modelo regulatório menos restritivo baseado na equivalência nutricional, não requer a rotulagem obrigatória. Outros países como Canadá, Japão, Coréia do Sul, China, Brasil e Argentina se encontram entre as políticas dos Estados Unidos e Comunidade Européia nessa questão (Nap, 2003).

A rotulagem não obrigatória defendida pelo governo norte americano tem suporte na sua agência de regulamentação de alimentos e medicamentos, *Food and Drug Administration* (FDA). O FDA atesta que alimentos geneticamente modificados comprovadamente equivalentes do ponto de vista nutricional aos seus correspondentes convencionais não requerem rotulagem. Essa proposta garante que os produtores de alimentos submetam obrigatoriamente ao FDA informações comprovadas quanto à qualidade nutricional e segurança de seus produtos.

Uma postura muito diferente da americana pode ser observada nos países da União Européia e por alguns países asiáticos. Em virtude do medo de que episódios semelhantes ao da “vaca louca” de 1995 se repitam, o Japão e, sobretudo a Europa iniciaram um boicote aos alimentos originados da biotecnologia. Mesmo com a biossegurança dos organismos geneticamente modificados assegurada pelos órgãos competentes, as resistências de organizações de consumidores e de ambientalistas, em vários países europeus, em aceitar as análises de risco propostas pelas agências reguladoras fizeram com que os governos recuassem na adoção dos OGM. A política de harmonização implementada entre 1992 e 1995 no âmbito da União Européia acabou sendo desestabilizada pela iniciativa de alguns países em declarar moratória na adoção dos OGM em seus territórios (Morris & Adley, 2000). Em 2000, a UE estabeleceu a exigência de rotulagem de alimentos que contivessem teores de OGM acima de 1% em seu conteúdo (European Union, 2000a; European Union, 2000b). Em abril de 2004, esse valor passou para 0,9% (European Union, 2004).

Para o Japão, o sistema para rotulagem de alimentos derivados da biotecnologia foi implementado em abril de 2001. O Ministério da Agricultura, Matas e Pesca (MAFF) e o Ministério da Saúde, do Trabalho e do Bem Estar do Japão (MHLW) anunciaram que o limite para contaminação não intencional de OGM seria de 5% nos casos de milho e soja (Hino, 2002).

Quanto a questões de rotulagem de OGM, o Brasil também se assemelha ao modelo europeu. De acordo com a Lei de Biossegurança 11.105, de 24 de março de 2005, os alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM ou derivados devem conter informações nesse sentido em seus rótulos (Brasil, 2005).

Além da Lei 11.105/05, o Brasil conta também com o Decreto 4.680, de 24 de abril de 2003, que estabelece que o consumidor deve ser informado da natureza “transgênica” desses produtos por meio de expressões nos rótulos ou embalagens, no caso do alimento ou ingrediente alimentar ser produzido ou conter organismos geneticamente modificados acima do limite de 1%. De acordo com o decreto, alimentos de origem animal derivado de espécies alimentadas com ração contendo ingredientes transgênicos também devem trazer no painel principal uma expressão indicando esse fato (Brasil, 2003).

Uma vez que no Brasil e no mundo há a regulamentação do uso da biotecnologia na agricultura e o estabelecimento da rotulagem de alimentos geneticamente modificados, a plena capacidade de identificação e quantificação em grãos, matérias-primas e produtos acabados, da presença de OGM e seus derivados se torna uma real necessidade.

Hoje no Brasil, encontram-se aprovados para plantio e comercialização dois eventos derivados da moderna biotecnologia: 1) a soja Roundup Ready®, que depois de ter aprovados por 3 safras consecutivas seu plantio e comercialização por meio de Medidas Provisórias, foi definitivamente liberada pela Lei de Biossegurança 11.105/05; 2) e o Algodão Bollgard®, aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança através de extrato de parecer técnico 513/05 publicado em Diário Oficial da União, em 24 de março de 2005.

Além dos eventos soja Roundup Ready® e algodão Bollgard® legalmente produzidos e comercializados, o Brasil importa outras matérias-primas, como o milho, que apresentam congêneres “transgênicos” amplamente cultivados em outros países. Isso é especialmente importante em relação às variedades de milhos geneticamente modificados que foram liberadas em seus países de origem apenas como ração animal, mas não para consumo humano.

Dessa forma, a identificação de matérias-primas quanto ao processo tecnológico envolvido na sua produção, se derivada da biotecnologia ou não, é importante não apenas para o controle da produção agrícola interna, mas também, dos produtos importados. A capacidade analítica de identificação e quantificação de resíduos de organismos geneticamente modificados em alimentos tem, portanto, papel central no atendimento às exigências legais que visam garantir o direito à informação do consumidor.

Os principais métodos de detecção de OGM disponíveis atualmente são baseados na detecção das seqüências de DNA introduzidas pelo processo de modificação genética, ou da(s) nova(s) proteína(s) originada(s) da expressão desse(s) gene(s) (Van Duijn *et al.*, 2002; Stave, 2002). No caso das seqüências

de DNA, os métodos são baseados na reação em cadeia da polimerase, conhecida como *Polymerase Chain Reaction* (PCR), na qual, a partir de quantidades ínfimas da sequência de DNA sob análise, são geradas cópias idênticas em quantidade suficiente para permitir sua detecção. Disponível para a detecção da proteína tem-se hoje os imunoensaios, como *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e a imunocromatografia, conhecido também como *Strip Test*.

O processo de PCR foi inventado por Kary Mullis no início da década de oitenta e encontra sua principal aplicação em situações em que a quantidade de DNA disponível é reduzida, uma vez que, em teoria, é possível amplificar qualquer DNA. É usado habitualmente nos laboratórios de investigação médica e biológica para uma variedade de tarefas, como a detecção de doenças hereditárias, diagnósticos virais, clonagem de genes, testes de paternidade, entre outros.

Para a execução da PCR, uma mistura contendo os desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), que são as unidades componentes das novas moléculas, os *primers* (ou iniciadores) e a enzima Taq DNA polimerase em uma solução tampão é adicionada ao DNA extraído da amostra em análise. Toda esta mistura é colocada no aparato de PCR, o termociclador, que alterna ciclos de temperatura preestabelecidos com tempos determinados.

Na primeira etapa do ciclo a temperatura é elevada a 94°C por pouco tempo para que haja a separação da dupla fita de DNA. Na segunda etapa a temperatura é baixada a uma temperatura próxima de 60°C para que os *primers* se pareiem com o DNA. Na última etapa do ciclo a temperatura é

elevada a 72°C para que a enzima *Taq* Polimerase possa agir sintetizando a nova molécula, em seguida um novo ciclo é iniciado. Normalmente são realizados de 30 a 40 ciclos para cada reação. A taxa de replicação da PCR é exponencial.

Sabendo-se que o fragmento de DNA inserido em uma planta geneticamente modificada durante a transformação apresenta três estruturas básicas: seqüência promotora, gene estrutural e seqüência terminal, o teste de PCR tem como alvo a amplificação de um desses três elementos.

Mesmo não havendo um consenso oficial internacional em relação aos testes para detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos, até o presente momento, o método capaz de detectar DNA (PCR) é preferido aos testes de detecção de proteína, devido principalmente a sua superior sensibilidade e especificidade.

Apesar das técnicas baseadas na PCR serem mais demoradas e mais exigentes quanto às condições laboratoriais e capacitação técnica, são também, em geral, mais sensíveis que aquelas baseadas na detecção de proteína. Uma vantagem adicional da PCR, importante na análise de alimentos, é o menor efeito sofrido pelas moléculas de DNA durante o processamento térmico. Apesar de tratamentos físicos e químicos (como aquecimento, mudanças de pH, atividade nuclease, refino) poderem levar à clivagem aleatória do DNA (Hemmer, 1997), é possível dirigir a PCR para amplificação de fragmentos pequenos. Assim, mesmo amostras de alimentos muito processados são passíveis de análise, o que explica o fato dos métodos baseados na PCR serem preferencialmente utilizados por órgãos de

fiscalização e controle de alimentos de diversos países, principalmente os da Europa.

A reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares. Não só é capaz de detectar a presença de organismos geneticamente modificados em alimentos como a PCR convencional como também permite a quantificação do OGM, ou seja, indica a porcentagem de conteúdo transgênico no alimento. A PCR em tempo real utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação de DNA. Uma maneira comum de revelação fluorescente do produto amplificado consiste na utilização do agente SYBR® Green, que se liga de maneira inespecífica ao DNA em fita dupla. O princípio do método está baseado na detecção de fluorescência no tubo de reação à medida que DNA dupla fita é gerado, em virtude da concentração do corante SYBR® Green entre as cadeias de DNA produzidas ao longo da amplificação. Esse sistema de luz pode ser usado para a detecção e quantificação em PCR em tempo real.

O equipamento de PCR em tempo real utiliza uma fonte de luz capaz de excitar o fluorocromo envolvido na reação. No início da amplificação, o sinal fluorescente emitido pelo SYBR® Green ligado ao produto de PCR é usualmente muito fraco para ser superior ao ruído emitido pelo fluoróforo. Durante a amplificação exponencial da PCR a emissão de fluorescência dobra a cada ciclo e é nesse ponto que se observa a melhor correlação entre quantidade de DNA inicial e a quantidade de produto formado. Quanto maior o número de cópias de DNA alvo no início da reação, menor o número de ciclos

necessários para se atingir o ponto onde o sinal de fluorescência é inequivocamente detectado acima do ruído de fundo.

Ainda que os métodos de detecção e quantificação de DNA sejam mais sensíveis e menos afetados pelo processamento, não estão isentos de limitações que podem inviabilizar sua aplicação na análise de alimentos ou gerar resultados falsos. Além da fragmentação das cadeias de DNA, a matriz alimentar pode ter efeitos negativos sobre a PCR (Gasch *et al.*, 1997). Uma vez que o componente essencial dessa reação de amplificação é a enzima *Taq* Polimerase, sua atividade está sujeita a uma série de interferentes ou inibidores normalmente encontrados em matérias-primas vegetais e alimentos processados, tais como: agentes quelantes (EDTA), polissacarídeos ácidos (pectinas e alginatos), detergentes, sais e compostos fenólicos. A matriz alimentar também pode ter efeito negativo não apenas sobre a enzima, mas também, sobre o DNA presente na amostra. Além da degradação por nucleases pode haver retenção física do DNA por outras macromoléculas, impedimento de acesso da enzima polimerase ao DNA-alvo e reação com componentes da matriz alimentar, como os compostos fenólicos e radicais livres gerados pela oxidação lipídica. Deste modo, poderá não haver amplificação do DNA pela polimerase e, conseqüentemente, a análise resultará negativa, ainda que o DNA do transgene esteja presente.

Para avaliar eventuais resultados falsos-negativos, a utilização de um gene de referência como controle de amplificação de DNA vegetal da espécie sob investigação se faz necessária. Apesar de não haver nenhuma recomendação oficial quanto à amplificação de seqüências de genes de referência, há um consenso quanto à importância da utilização dessas

seqüências específicas e altamente conservadas, como alvos para um controle de todo o processo. Dessa forma, a presença de determinados ingredientes (soja ou milho, por exemplo) pode ser atestada pela amplificação de genes específicos para cada espécie vegetal. Para a soja, o gene da lectina tem sido amplamente empregado com gene de referência para a finalidade de detecção e quantificação de OGM em alimentos pelo método de PCR. No caso do milho, quatro diferentes sistemas têm sido aplicados. São eles os genes que codificam para as enzimas: 3-hidroxi 3- metilglutaril-coenzima redutase I (gene *hmgA*), invertase (gene *ivr1*), álcool desidrogenase (gene *adh1*) e zeína (gene *zeína*).

No período de 2000 a 2003, um estudo para a identificação e caracterização de genes de referência espécie-específicos, adequados para a detecção de OGM por PCR qualitativo e quantitativo, foi realizado pelo grupo QPCRGMFOOD da Comunidade Européia. A estabilidade do gene da lectina e o número de cópias foram determinados para 20 linhagens distintas de soja usando iguais quantidades de DNA genômico como molde para a reação de PCR em tempo real. Os resultados indicaram que o número de cópias do gene da lectina foi idêntico para todas as 20 linhagens e que ele é um gene de uma única cópia no genoma haplóide da soja. Nenhum sinal positivo de PCR foi obtido para amostras não contendo DNA de soja, mostrando alta especificidade para o sistema de referência aplicado (Holst-Jensen, 1999).

Para o milho, como mencionado anteriormente, quatro diferentes sistemas foram estudados. Uma pré-validação feita em 4 laboratórios mostrou que a utilização dos sistemas *hmgA*, *ivr1* e *adh1* e, provavelmente, também

zeína, são adequados para a quantificação de DNA genômico de milho (Holst-Jensen, 1999).

Apesar de sua alta sensibilidade, as técnicas de análise por detecção de DNA não podem ser aplicadas indiscriminadamente em todos os tipos de alimentos ou matrizes existentes. Há certa restrição do controle mais efetivo da identidade das matérias-primas alimentares, se convencionais ou originadas da biotecnologia, a grãos e derivados menos processados, como por exemplo, as farinhas. Como anteriormente mencionado, produtos mais elaborados, que passam por várias etapas de processamento e resultam da agregação de diversas matérias-primas ou ingredientes, são mais difíceis de analisar devido à degradação excessiva do DNA, presença de inibidores e interferentes e ao fator de “diluição”. Produtos mais purificados, como óleos, são praticamente isentos de DNA (Gryson *et al.*, 2002; Pauli *et al.*, 1998). Como consequência, existe um entrave técnico ao cumprimento das normas de rotulagem, uma vez que o isolamento de DNA em quantidade e qualidade adequadas é a primeira etapa e um requerimento básico para a detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos.

Para vencer essa barreira o procedimento de extração e purificação de DNA de alimentos deve ser adequado ao tipo de matriz e à sua composição. Vários procedimentos empregados na pesquisa vegetal têm sido aplicados com sucesso em algumas matérias-primas alimentares, porém, é possível que vários métodos devam ser combinados, modificados ou então novas etapas sejam incluídas para que resulte em extração de DNA em quantidades adequadas e sem contaminantes. Considerando a diversidade de produtos alimentícios, a otimização de metodologias específicas para cada produto é

difícil. Contudo, pode ser possível estabelecer metodologias de extração mais adequadas para determinadas classes e categorias de alimentos, definidas com base nos principais componentes e tipo de processamento, nas quais a probabilidade de ocorrência de material geneticamente modificado é maior.

Diferentes protocolos de extração de DNA têm sido escolhidos de acordo com a natureza e o tipo de material de partida. Além de alguns protocolos clássicos de extração de DNA de plantas (Doyle & Doyle, 1990; Dellaporta *et al.*, 1983), publicados em artigos científicos, existem também alguns produtos comerciais baseados em digestão celular (pelo uso de reagentes caotrópicos), colunas de sílica com afinidade por ácidos nucleicos e partículas magnéticas, entre outros.

O método CTAB, que foi primeiramente descrito por Murray e Thompson em 1980, e posteriormente modificado por Wagner e colaboradores em 1987, é um método apropriado para a extração e purificação de DNA de plantas e derivados e, em particular, adequado para a eliminação de polissacarídeos e compostos fenólicos que podem afetar a pureza e a qualidade do DNA. Esse procedimento tem sido amplamente aplicado na extração de DNA de plantas e já foi avaliado em testes de validação para se detectar OGM em matrizes menos complexas de alimentos, como farinha de soja e milho (Lipp *et al.*, 1999; Lipp *et al.*, 2001). Várias modificações já foram desenvolvidas para se adaptar o método a uma variedade maior de matrizes alimentares processadas como milho tratado termicamente, carne e leite, biscoitos e *baby food* (alimentos infantis) (Hupfer *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1997; Poms *et al.*, 2001, Olexova *et al.*, 2004). Contudo, apesar de já testado e de ter sido satisfatório para algumas matrizes, não existem relatos na literatura de extração de DNA através desse

método de alimentos altamente processados, tais como embutidos, sorvetes, margarinas e derivados de milho.

Métodos de purificação do DNA genômico por ligação a coluna de sílica, disponível em formato de kits comerciais, tais como o DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), são também utilizados pela sua conveniência e pela eficácia no isolamento de DNA genômico de tecidos vegetais. Outra vantagem é que não requerem uso de solventes como fenol ou clorofórmio durante a extração e envolvem poucas etapas de manipulação das amostras. Além disso, esses métodos têm se mostrado eficiente na extração de DNA de algumas matrizes menos complexas como farinha de soja (Corbisier *et al.*, 2005).

Uma evidente conveniência do método de coluna de sílica é a sua rapidez quando comparado ao método CTAB. O método de coluna de sílica é capaz de permitir a purificação de DNA em até 1 hora, enquanto que o método CTAB pode demorar até 6 horas.

O método CTAB, por sua vez, tem a seu favor o baixo custo e a independência de kits comerciais, usualmente de custo elevado. O método de coluna de sílica pode custar até cinco vezes o valor do método CTAB por amostra e não é produzido no país, fazendo necessária a sua importação.

A maior adequação dos protocolos de extração de DNA aos produtos acabados presentes no mercado traria uma contribuição direta para a qualidade dos resultados obtidos e, conseqüentemente, facilitaria o atendimento às normas de rotulagem e ao código do consumidor.

Diante do exposto, a justificativa da proposta seria a existência de um entrave técnico na metodologia de detecção de resíduos de organismos geneticamente modificados em alguns tipos de matrizes alimentares, uma vez que a adequação da técnica de PCR para detectar organismos geneticamente modificados em alimentos processados é determinada pela qualidade e quantidade de DNA ainda presente no produto final. Nesses casos ao favorecer a ocorrência de resultados falso-negativos, não assegura que o consumidor tenha conhecimento da natureza transgênica dos produtos.

Assim, seria interessante conhecer os fatores, característicos de cada grupo de produto alimentício testado, que afetam a extração de DNA e os meios necessários para obtenção de material com quantidade e qualidade adequada para a análise por PCR. A consequência direta disso, ainda no curto prazo, pode ser o emprego dos métodos e estratégias mais adequados a cada tipo de alimento, levando a resultados mais precisos e confiáveis. No médio prazo esse é um avanço que permitirá que etapas posteriores da análise também sejam refinadas e ajustadas. Como consequência, os métodos poderão ser adaptados a uma diversidade maior de produtos.

2. OBJETIVO

O objetivo do projeto foi avaliar a qualidade, a quantidade e a capacidade de amplificação por PCR de DNA extraído de grãos de soja e milho, seus derivados e produtos acabados contendo como ingredientes obtidos desses grãos, com vistas à detecção de resíduos de organismos geneticamente modificados pelas técnicas de detecção de DNA (PCR).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Foram estabelecidas quatro categorias de materiais a serem analisados: (1) os grãos de soja *in natura* e os insumos para a indústria de alimentos derivados desse grão, (2) os grãos de milho *in natura* e os insumos para a indústria de alimentos derivados desse grão, (3) produtos acabados contendo ingredientes de milho ou soja em sua composição e (4) produtos acabados contendo ingredientes de milho e soja em sua composição.

Para a extração de DNA foi utilizado o método CTAB, bastante aplicado em análises extração de DNA de plantas e já avaliado em testes de validação para se detectar OGM (Lipp *et al.*, 1999; Lipp *et al.*, 2001). Paralelamente, foi utilizado um método de coluna de sílica disponível comercialmente no formato de *kits* para isolamento de DNA genômico de espécies vegetais, uma vez que produzem resultados mais rapidamente, tem boa reprodutibilidade e tem qualidade atestada pelo controle efetuado na fabricação.

O DNA isolado dos materiais foi avaliado quanto ao rendimento e pureza pela leitura espectrofotométrica. A quantidade de DNA foi determinada pela leitura de absorbância a 260nm.

A efetiva qualidade e quantidade do DNA extraído foram avaliadas pela PCR convencional e pela PCR em tempo real. As amostras de DNA foram submetidas a testes de amplificação de genes naturalmente presentes nas espécies vegetais, como a invertase em milho, e a lectina em soja. Para isso,

foram empregados *primers* específicos, utilizados em métodos validados e disponíveis na literatura. O sucesso na amplificação desses genes foi um indicador da obtenção de DNA de alta qualidade em quantidade suficiente, isento de interferentes e inibidores da *Taq* polimerase.

3.2 Materiais

Foram estabelecidas quatro categorias de materiais a serem analisados:

(1) os grãos de soja *in natura* e os insumos para a indústria de alimentos derivados desse grão, (2) os grãos de milho *in natura* e os insumos para a indústria de alimentos derivados desse grão, (3) produtos acabados contendo ingredientes de milho ou soja em sua composição e (4) produtos acabados contendo ingredientes de milho e soja em sua composição.

Um total de 32 matrizes de alimentos foram analisadas: oito matrizes pertencentes a categoria 1, nove pertencentes a categoria 2, oito pertencentes a categoria 3 e sete pertencentes a categoria 4. A tabela contendo a descrição completa dos ingredientes da cada matriz se encontra em anexo (anexo 1).

As amostras de grãos *in natura* e alimentos processados foram adquiridos diretamente de supermercados. Os insumos para a indústria de alimentos foram obtidos a partir de empresas especializadas. As 32 matrizes estão distribuídas em 4 categorias da seguinte forma:

3.2.1 Categoria 1

A categoria 1 foi composta pelos grãos de soja (*Glycine max L.*) *in natura* e os insumos para a indústria de alimentos derivados desse grão (8 matrizes), a saber:

- a) Grãos de soja;
- b) Farelo de soja;
- c) Alimento torrado desengordurado (“torta”);
- d) Lecitina de soja;
- e) Óleo de soja bruto degomado;
- f) Óleo de soja refinado;
- g) Proteína isolada de soja;
- h) Proteína texturizada de soja.

3.2.2 Categoria 2

A categoria 2 foi composta pelos grãos de milho (*Zea mays L.*) *in natura* e os insumos para a indústria de alimentos derivados desse grão (9 matrizes):

- a) Milho em grãos;
- b) Óleo de milho bruto;
- c) Óleo de milho refinado;
- d) Amido;
- e) Maltodextrina;
- f) Dextrose;
- g) Xarope de frutose;
- h) Xarope de glicose;
- i) Farelo de glúten.

3.2.3 Categoria 3

A categoria 3 foi constituída por produtos acabados contendo ingredientes de milho ou soja em sua composição (8 matrizes), a saber:

Quatro (4) produtos acabados, contendo ingredientes de soja:

- a) Bolo sabor artificial de baunilha (contendo farinha de soja);
- b) Bebida a base de soja (contendo extrato de soja);
- c) Hambúrguer vegetal sabor frango (contendo proteína texturizada de soja);
- d) Farinha de soja (contendo grãos de soja torrados e moídos);

Quatro (4) produtos acabados contendo ingredientes de milho:

- e) Farinha de milho flocada (contendo grãos torrados);
- f) Amido de milho comercial (contendo amido);
- g) Adoçante dietético em pó (contendo maltodextrina);
- h) Cobertura sabor caramelo (contendo xarope de glicose).

3.2.4 Categoria 4

A categoria 4 foi constituída por produtos acabados contendo ingredientes de milho e soja em sua composição (7 matrizes):

- a) Alimentado achocolatado em pó (contendo maltodextrina e lecitina de soja);
- b) Barra de proteína com cobertura de chocolate (contendo xarope de frutose, xarope de glicose, óleo de milho, proteína isolada de soja e lecitina de soja);
- c) Sorvete sabor leite condensado com frutas vermelhas (contendo dextrose, xarope de glicose, amido e lecitina de soja);
- d) Margarina (contendo óleo vegetal e lecitina de soja);
- e) Ração para frango (contendo fubá de milho, farelo de glúten e “torta”);
- f) Salsicha de frango (contendo proteína texturizada de soja, amido e maltodextrina);

- g) Mistura para creme de milho (contendo farinha de milho, amido, maltodextrina, milho, farinha de soja e lecitina de soja).

3.2.5 Classificação das matrizes alimentares

A escolha dos insumos para a indústria (produto do fracionamento industrial dos grãos) para as categorias 1 e 2 foi baseada nos produtos de soja e milho de importância e relevância na indústria de alimentos e também na disponibilidade para análise. O objetivo da inclusão das categorias 3 e 4 foi de avaliar os efeitos de interferentes da matriz, o fator de diluição dos ingredientes e também o possível efeito de eventual processamento adicional nos produtos acabados. Os produtos para as categoriais 3 e 4 foram selecionados em função da presença das frações das categorias 1 e/ou 2 como ingrediente declarado em rótulo (ver anexo 1).

Existem poucas aplicações da soja não-processada em alimentos, uma vez que ela naturalmente contém uma série de componentes, tais como inibidores de tripsina, lectinas e fitatos (Rackis, 1974; Orthofer, 1978), que podem atuar como antinutrientes se a soja não for adequadamente aquecida durante o preparo. Por esse motivo, a soja é consumida principalmente na forma dos produtos do seu processamento: óleos, farelos e isolados protéicos, entre outros.

As etapas de processamento industrial da soja usado para produzir óleos e outros derivados estão descritos na figura 1. Os três maiores produtos *commodities* de soja são: sementes, óleos e alimento torrado desengordurado (conhecido como “torta”) (OECD, 2001).

Em verde estão destacadas as frações avaliadas neste estudo

Figura 1. Etapas do processamento industrial do soja adaptado de OECD (2001).

A principal fração de soja usada pela indústria de alimentos é o óleo, que é empregado em margarinas, gorduras, óleos para cozinha e salada (American Soybean Association, 1999). De todos os óleos extraídos de sementes comercializados no mercado internacional, o da soja é predominante (Smith & Huyser, 1987).

Durante o processamento da soja, os grãos são inicialmente separados em grãos quebrados e grãos inteiros. Dos grãos quebrados e lascados é que o óleo é extraído mecanicamente por prensagem seguido de uma extração com solvente orgânico. A soja desengordura que deixa a prensa é submetida à ação de solventes orgânicos (N-hexano), que dissolve praticamente todo o óleo residual. O solvente é recuperado e o óleo separado é misturado ao óleo bruto que foi retirado na prensagem. Essa mistura de óleo segue então para a separação da lecitina. A lecitina, um fosfolipídio, utilizado como emulsificante, lubrificante e estabilizador natural, consiste de 1,5 a 3% do óleo bruto e é separada por hidrólise e centrifugação do óleo (Mandarino & Roessing, 2001).

O produto sem lecitina é chamado de óleo bruto degomado. O óleo degomado pode ainda sofrer processo de refinação. O processo de obtenção do óleo de soja refinado a partir do óleo bruto inclui as principais etapas: degomagem, neutralização ou desacidificação, branqueamento e desodorização. Durante a degomagem, o óleo bruto passa por aquecimentos que variam de 60 a 80°C, é centrifugado a aproximadamente 5.000 rpm e submetido à pressão de aproximadamente 100mm de Hg. A neutralização consiste na adição de soluções aquosas de álcalis, tais como hidróxido de sódio ou carbonato de sódio, centrifugação e aquecimentos que podem chegar a até 95°C. O branqueamento é atingido pela adsorção dos pigmentos com

terras clarificantes preparadas a partir de silicato de alumínio. A adsorção dos pigmentos é acompanhada de filtragens e centrifugações. Por fim, a desodorização do óleo é alcançada durante processo de pressão absoluta de 2 a 8 mm de Hg a uma temperatura de 20 a 25°C (Mandarino & Roessing, 2001).

O óleo refinado pode ainda ser submetido à hidrogenação, um processo que visa conservar o óleo, por meio da eliminação das duplas ligações entre os átomos de carbono dos ácidos graxos insaturados que formam os triglicérides que compõem o óleo, bem como dos ácidos graxos livres. Essas duplas ligações constituem-se em pontos de oxidação dos óleos e levam à sua rancificação. O óleo vegetal hidrogenado constitui-se numa das matérias primas que entram na formulação para a produção de margarinas. A hidrogenação é uma reação que ocorre a altas temperaturas (160 a 180°C podendo atingir 200°C na fase final do processo) (Mandarino & Roessing, 2001).

Parte do farelo de soja desengordurado, obtido da prensagem dos grãos, é submetido a uma dessolventização e tostagem para eliminar o solvente e inativar termicamente fatores antinutricionais como inibidores de tripsina, lectinas e fitohemaglutininas, bem como substâncias que causam sabor indesejável. Essa etapa, que produz a chamada “torta” de soja, é feita num tostador, um equipamento que combina basicamente a evaporação do solvente com uma cocção úmida. O tempo de permanência do farelo no tostador é de cerca de uma hora e a temperatura de cocção atinge de 85 a 115°C. A aplicação primária da torta está na ração animal (97%), sendo 46% destinados à ração para aves, 32% para porcos e 9% para gado de corte.

Apenas uma pequena parte é usada na ração de animais domésticos (OECD, 2001).

A outra parte do farelo desengordurado passa por um processo de dessolvatização para eliminação do n-hexano e pode ser empregado em diversos produtos alimentícios, como molho de soja e produtos que simulam leite e carne (American Soybean Association, 1999), ou então pode ser utilizada como fonte para a obtenção dos diferentes tipos de isolados protéicos, farinhas de soja e fibras de proteína. A remoção de açúcares, a extração alcalina, a hidrólise enzimática em meio ácido, a extrusão a alta temperatura, a centrifugação, a adição de lecitinas e gorduras fornecem respectivamente proteína de soja texturizada, proteína isolada, proteína hidrolisada, proteínas texturizada, fibra de proteína e farinha de soja (OECD, 2001).

A proteína isolada de soja é preparada por um processo envolvendo extração de água e calor mínimo nos flocos de soja. Esse produto é praticamente livre de carboidratos e gordura e tem 90% de proteína em peso seco. As proteínas isoladas de soja são usadas como uma alternativa nutricional, funcional ou econômica para proteínas tradicionais em barras de cereais, bebidas, pães, bolos e biscoitos, cereais, entre outros.

A proteína texturizada de soja é um produto obtido da farinha desengordurada de soja, por processo de extrusão em condições adequadas. Com teor mínimo de 70% de proteína, seu uso se estende pelos mais diversos tipos de produtos, tais como barras energéticas e protéicas, cereais matinais, *snacks* e produtos cárneos, entre outros.

As proteínas concentradas de soja são obtidas removendo-se uma porção dos carboidratos dos grãos de soja desengordurados e descascados. As proteínas concentradas de soja contém pelo menos 65% de proteína e devem estar livres de qualquer umidade. Frequentemente são usadas como ingrediente funcional ou nutricional em uma grande variedade de produtos alimentícios.

No caso do milho, embora este seja uma boa fonte de energia, apenas uma pequena quantidade de grãos de milho inteiros é consumida por seres humanos quando comparada aos ingredientes alimentares derivados do milho (Hodge, 1982; Watson, 1988).

O grão de milho é composto de uma dura camada externa (pericarpo), do germe e do endosperma (Watson, 1988). O pericarpo é uma cobertura muito fibrosa de celulose e hemicelulose que precisa ser quebrada ou removida para que o grão possa ser consumido ou processado. O germe, a única parte viva do grão de milho, contém em torno de 50% de óleo enquanto que o endosperma contém 70% de amido (Eckhoff e Paulsen, 1996).

O processamento industrial do milho tem sido utilizado para separar esses componentes e produzir derivados para alimentos (67%) e ração (33%) (Newcomb, 1995). Existem três tipos de processamento: por via úmida, por via seca e aquele destinado à ração, sendo o processamento por via úmida o mais importante. As etapas de processamento industrial do milho por via úmida, para produzir óleos e insumos para alimentos, estão descritos na figura 2 (OECD, 2002).

Durante o processamento do milho por via úmida, os grãos são limpos e embebidos em água quente (49°C a 54°C) e em dióxido de enxofre (0,1 a 0,2 %) para amaciar o pericarpo. Os grãos amaciados são então quebrados mecanicamente e submetidos a um processo de flotação que separa o germe do endosperma.

A fração do germe é então prensada para separar o óleo bruto que dependendo do tratamento recebido ao longo do seu refino pode ser usado em margarinas, óleo refinado e óleo de fritura (Orthoefer & Sinram, 1987). Semelhante ao processamento do óleo de soja, o refino e hidrogenação do óleo bruto de milho também pode ocorrer. O farelo de germe restante da prensagem é então seco e adicionado ao glúten de milho para ração.

O endosperma é finalmente moído e passado por peneiras para a remoção de cascas fibrosas. As cascas fibrosas são também adicionadas ao glúten de milho para ração, enquanto que o endosperma peneirado é centrifugado para separar a porção amido do glúten. O glúten é seco e usado como farelo de glúten para ração.

As frações destacadas em verde indicam que foram avaliadas neste estudo.

Figura 2. Etapas do processamento industrial do milho por via úmida adaptado da OECD (2002).

O preço baixo e a pronta disponibilidade do milho resultaram no desenvolvimento de um grande número de ingredientes de uso industrial. O milho é um material bruto excelente para a obtenção do amido, por causa não somente do preço e da disponibilidade, mas também porque o amido é recuperado facilmente e tem pureza elevada (Anderson & Watson, 1982). Em torno de 40% do amido é consumido diretamente como alimento ou utilizado na indústria para outros propósitos, enquanto 60% é convertido em vários tipos de xaropes adoçantes (Campbell *et al.*, 1995).

O amido de milho é também utilizado na indústria de alimentos, contudo a maioria dele é convertida a uma variedade de adoçantes como xarope de glicose e xarope de frutose e produtos de fermentação, incluindo o álcool (Watson, 1988; Anderson & Watson, 1982). A fermentação, a hidrólise, a isomerização, a digestão enzimática, a alta pressão/aquecimento do amido fornecem respectivamente derivados: álcool de milho, maltodextrina, xarope de frutose, dextrose e xarope de glicose (OECD, 2002).

O xarope de glicose tem várias aplicações na indústria de alimentos, atuando como umectante, conferindo transparência e brilho, evitando a cristalização de lactose e sacarose. Além disso, proporciona estabilidade de cor e ajuste de consistência, entre outros, e por isso está presente em grande número de alimentos industrializados. O xarope de frutose tem alto poder adoçante e é bastante utilizado para conferir sabor doce em bebidas e sucos, entre outros. A dextrose, que é produzida enzimaticamente a partir de amido, também tem vários usos em alimentos, podendo ser aplicada para acentuar sabor, conferir textura, reduzir o ponto de congelamento, proporcionar maciez e cremosidade aos alimentos. Por sua vez, as maltodextrinas não têm poder

adoçante, mas contribuem para a viscosidade e dão “corpo” aos alimentos. E, finalmente, o amido serve ainda como principal fonte de açúcar para a fermentação na produção de bebidas alcoólicas.

A alimentação animal é, certamente, o principal uso mundial do milho, com a maioria da produção anual destinada à alimentação de gado, aves, e suínos (Hodge, 1982; Perry, 1988; Watson, 1988). Apesar de, em nutrição animal, o milho ser na grande maioria utilizado diretamente na forma de grão, a indústria do milho produz também uma série de derivados que entram na formulação de rações, sendo os mais importantes o glúten de milho e o farelo de glúten. A maioria do glúten do milho é usada para alimentar ruminantes e uma pequena parte é destinada a suínos. O maior uso do farelo de glúten é para dietas de aves, pois o glúten contém pigmentos carotenóides importantes para coloração da pele e gema de ovos das aves.

Como o Decreto 4.680, de 24 de abril de 2003 (Brasil, 2003), exige ainda a rotulagem de animais alimentados com OGM, é interessante analisar alguns dos principais insumos utilizados no preparo de rações destinadas à alimentação de animais criados para consumo humano.

3.3 Métodos

3.3.1 Preparo da amostra

Amostras de maior resistência mecânica, como os grãos de milho e soja foram devidamente particuladas, previamente a extração de DNA, em moinhos de bolas modelo Pulverissete 5 da Fritsch, de acordo com as instruções do fabricante.

Amostras de menor dureza (farelos de milho e soja, farinha de milho flocada, massa de bolo sabor artificial de baunilha, hambúrguer vegetal, ração para frango, salsicha de frango, barra de proteína com cobertura de chocolate) foram trituradas e homogeneizadas com uso de triturador elétrico (modelo DCG – 20, Cuisinart®).

Amostras líquidas, de maior ou menor viscosidade (lecitina de soja, óleos, xarope de frutose, xarope de glicose, bebida a base de soja, cobertura sabor caramelo) e sólidas consideradas homogêneas (sorvete, proteínas de soja, amido, maltodextrina, dextrose, glúten de milho, farinha de soja, creme de milho, adoçante dietético em pó, margarina e alimento achocolatado em pó) não sofreram nenhum tipo preparo e foram diretamente submetidas à extração de DNA.

Como a reação de PCR é capaz de amplificar uma única molécula de DNA alvo, precauções foram tomadas para prevenir a contaminação entre o

preparo de diferentes amostras com resíduos de DNA. Tanto o triturador elétrico, como o moinho de bolas foram devidamente descontaminados por imersão em solução de hipoclorito de sódio e posterior exposição à luz UV entre uma extração e outra.

A irradiação ultravioleta (254 a 300nm) de equipamentos e materiais de trabalho entre o preparo de uma amostra e outra bloqueia a replicação de seqüências de DNA contaminante por induzir a formação de dímeros de timidina (TT). Uma vez criada, essa estrutura modificada não pode ser mais removida de moléculas molde de DNA dupla ou simples fita. Esse processo de controle de contaminação explora a presença de dímeros de timidina uma vez que eles estericamente bloqueiam a extensão da fita de DNA durante a PCR (Mifflin, 1997).

A descontaminação química de superfícies e equipamentos utilizando-se hipoclorito de sódio também é bastante eficiente para eliminação de resíduos de DNA. Tratamentos de 1 minuto com solução de hipoclorito de sódio (10%) tem se mostrado suficientes para eliminar DNA e prevenir a amplificação por PCR de fragmentos de até 600 pares de base (Prince & Andrus, 1992).

3.3.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA genômico das amostras os métodos foram selecionados com base em duas diferentes abordagens para a extração de DNA de vegetais e produtos derivados: (a) o método CTAB (Brometo de hexadecil-trimetil-amônio) e (b) o método de coluna de sílica (colunas que combinam a propriedade de ligação das membranas de gel de sílica ao DNA

com tecnologia de microcentrifugação). Para ambos métodos de extração, todas as amostras foram extraídas em duplicata.

3.3.2.1 CTAB (Brometo de hexadecil-trimetil-amônia)

Para o método CTAB, a tomada de amostra foi de 300 mg para todas as matrizes. Para a extração de DNA procedeu-se uma etapa de lise térmica a 65°C na presença de CTAB seguida por várias etapas de extração a fim de remover contaminantes como polissacarídeos (digestão com alfa-amilase) e proteínas (digestão com proteinase K). O clorofórmio foi utilizado para separação dos ácidos nucleicos do CTAB e dos complexos polissacarídeos/proteínas. Por fim, os ácidos nucleicos foram purificados pela precipitação com isopropanol e lavados com etanol. O material obtido foi dissolvido em 100 µL de tampão Tris-EDTA, pH 8,0 (TE).

3.3.2.2 Coluna de sílica

O kit comercial Dneasy® Plant Mini Kit da Qiagen foi o método de coluna de sílica utilizado nesse estudo. Seguindo instruções do fabricante, a tomada de amostra foi de 100 mg para todas as matrizes. Para a extração de DNA procedeu-se uma etapa de lise térmica também a 65°C na presença de um tampão de lise. Após a lise, contaminantes como polissacarídeos e proteínas foram precipitados através da utilização de solução salina. Em seguida, o DNA foi ligado à coluna de sílica na presença de alta concentração de um sal caotrópico (cloridrato de guanidina) enquanto que novamente contaminantes

remanescentes (polissacarídeos e proteínas) foram removidos por eluição com isopropanol. Finalmente o DNA foi eluído da coluna com de 200 μ L de tampão de baixa concentração salina.

3.3.3 Análise espectrofotométrica do DNA

Os extratos de DNA foram quantificados e submetidos à análise de pureza em espectrofotômetro, na faixa UV.

Um volume de 100 μ L de cada extrato obtido a partir do método baseado em colunas de sílica foram distribuídos em microplaca de 96 poços (modelo UV STAR da marca Greiner Bio One) e quantificados espectrofotometricamente em leitora de absorbância Genios da marca TECAN®.

Os extratos de DNA obtidos pelo método CTAB foram a princípio diluídos 10 vezes no tampão TE de eluição, antes de serem quantificados na mesma leitora citada anteriormente.

A quantificação dos extratos foi feita a 260 nm. A relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm foi utilizada para indicar pureza do material.

3.3.4 Amplificação de DNA

Neste trabalho, a amplificação de seqüências-alvo dos genes da lectina da soja e da invertase do milho foi utilizada como confirmação da presença de resíduos de soja e milho em alimentos, respectivamente. A detecção desses

fragmentos de DNA dos chamados genes de referência pode indicar quando o DNA extraído das matrizes alimentares se encontrava em quantidade e qualidade suficientes para serem amplificados pela PCR. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados como *primers* na PCR para genes de referência de milho e soja foram aquelas descritas por Vollenhofer (1999). Na amplificação do gene da lectina de soja foi utilizado o *primer sense* LEC 1 e o *primer antisense* LEC 2, que resultam num *amplicom* de 164 pares de bases. No caso do gene da invertase de milho, os *primers sense* INV A e *antisense* INV B foram combinados para amplificar um fragmento de 122 pares de bases (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição de *primers*, adaptado de Vollenhofer (1999)

<i>Primer</i>	Seqüência	Gene	Posição	Número Acesso ^a
LEC 1	(5'-GTGCTACTGACCAGCAAGGCAAACCTCAGCG-3')	lectina da soja	70-99 da CDS ^b	K00821
LEC 2	(GAGGGTTTTGGGGTGCCGTTTTCTGCAAC-3')		205-233 da CDS	
INV A	(5'-GGCCGGATCGTCATGCTCTAC-3')	invertase do milho	984-1005 da CDS	U16123
INV B	(5'-TTGGCGTCCGACTTGACCCACT-3')		1084-1105 da CDS	

^a Número de acesso no GENBANK, ^b Seqüência codificante

Resultados de estudos anteriores (Ebbehoj & Thomsen, 1991; Allmann, 1992; Meyer *et al.*, 1996) mostraram que o uso de seqüências-alvo de pequeno tamanho é fundamental para a detecção molecular de material modificado geneticamente em alimentos processados, uma vez que tratamentos industriais podem resultar em fragmentação do DNA (Bauer *et al.*, 2003). Como pode ser observada na tabela 2, a detecção de alimentos processados deve ter como alvo seqüências não superiores a 500 pares de base.

Tabela 2. Média do comprimento de DNA isolado de alimentos processados.

Adaptado de Hemmer (1997).

Alimento	Tratamento	Tamanho do fragmento de DNA ^a	Referência
Carne	Fresca	~ 30.000	Ebbehøj and
	80°C, 10 minutos	~ 30.000	Thomsen (1991)
	100°C, 10 minutos	~ 1.100	“
	120°C, 30 minutos	~ 300	“
	121°C, 20 minutos	~ 400	Meyer <i>et al.</i> (1993)
Salsicha	n.l. ^b	20.000	Candrian (1994)
Salame	n.l.	100 – 15.000	
Patê de fígado	n.l.	100 – 1.500	
Patê enlatado	n.l.	100 – 300	
Farinha	n.l.	Alto peso molecular	Allmann <i>et al.</i>
Pão	n.l.	300	(1992)
Preparados com proteína de soja	n.l.	100 - 400	Meyer <i>et al.</i> , (1996)
Produtos processados a base de tomate (ketchup, purê de tomate, polpa de tomate)	n.l.	400	Ford <i>et al.</i> (1996)
Milho enlatado	n.l.	300	Pietsch <i>et al.</i> (1997)
Polpa de tomate			
Preparados com proteína de soja			

^a tamanho do fragmento em pares de base, ^b não informado

De fato, para o presente trabalho foram selecionados *primers* que resultavam em *amplicons* de 122 (gene da invertase) e 168 pares de base (gene da lectina) para análise da presença de milho e soja, respectivamente.

Os extratos de DNA de todas as amostras das categorias 1, 2, 3 e 4, obtidos tanto pelo método CTAB quanto pelo método de coluna de sílica, foram submetidos a reação de amplificação do gene da lectina da soja e do gene da invertase do milho.

As reações de amplificação, assim como a sequência de *primers*, foram realizadas de acordo com Vollenhofer (1999) em volume total de 25 µL. As reações foram compostas de um volume de 5 a 14 µL de DNA extraído, dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) numa concentração final de 0,2 mM cada, 2,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 1 µM de cada um dos *primers* (*sense* e *antisense*) e 0,75 a 1 unidade de *Taq* polimerase do tipo *Hotstart* (*Taq* Platinum, da marca INVITROGEN®).

As condições de amplificação foram: desnaturação a 95°C por 12 minutos seguidos de 30 a 40 ciclos de 95°C por 60 segundos, incubação a temperatura apropriada para o par de *primers* (72°C para lectina e 66°C para invertase) por 30 segundos, extensão à 72°C por 30 segundos e finalmente etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Mastercycler Gradient da marca EPPENDORF®.

3.3.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR obtidos foram aplicados em gel de agarose 2,0 % (Ultra Pure da marca GIBCO BRL) corado com solução de Brometo de Etídio (INVITROGEN) e então submetidos à eletroforese em tampão TAE (Sambrook *et al.*, 1989). As corridas foram conduzidas por aproximadamente 50 minutos a 120mA. Os fragmentos separados foram visualizados por fluorescência no transiluminador de luz ultravioleta modelo Alphamager 2200 da marca Alpha Inotech Corporation e a imagem foi capturada digitalmente através do software Alphamager também da Alpha Inotech Corporation.

3.3.6 PCR em tempo real

A invertase em milho e a lectina em soja utilizadas na PCR convencional também constituíram o alvo de amplificação pela reação de PCR em tempo real. Os *primers* utilizados para ambos alvos foram os mesmos indicados na tabela 1.

Os extratos de DNA, obtidos pelo método CTAB e pelo método de coluna de sílica, que apresentaram resultado positivo para a amplificação de DNA pela PCR convencional dos genes de referência lectina e/ou invertase foram submetidos a reação de amplificação pela técnica de PCR em tempo real.

As reações de amplificação em tempo real foram realizadas em microplacas de 96 poços MicroAmp®. As reações foram compostas de SYBR® Green Master Mix da Applied Biosystems (incluindo AmpliTaqGold® DNA Polimerase, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, marcador SYBR® Green, MgCl₂, tampão de PCR, referência passiva ROX), 500 nM de cada um dos *primers* (*sense* e *antisense*) e um volume de 10 µL de DNA extraído. As reações foram realizadas em volume total de 25 µL.

A entrada de DNA na reação de PCR em tempo real foi padronizada para um valor aproximado de 100ng. Para isso, com base nos valores da quantificação espectrofotométrica, os extratos de DNA foram diluídos para uma concentração aproximada de 10ng/ µL.

As condições de amplificação foram: desnaturação a 95°C por 10 minutos seguidos de 45 ciclos de 95°C por 45 segundos e 62°C por 60 segundos.

As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em equipamento 7300 Real-Time PCR System da Applied Biosystems.

Os resultados das curvas de amplificação e dos valores de *threshold cycle* (Ct), que representa o ciclo da PCR no qual o software SDS detecta o primeiro aumento significativo de fluorescência acima do sinal de base para uma determinada amostra, obtidos pela PCR em tempo real foram analisados através do software SDS da Applied Biosystems.

4. RESULTADOS

4.1 Leitura espectrofotométrica

4.1.1 Rendimento

Os extratos de DNA foram quantificados por espectrofotometria na faixa ultravioleta (UV). A quantificação dos extratos foi feita considerando que uma solução de DNA dupla fita a concentração de 50 ng/μL apresenta densidade ótica de 1,0 a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

Em função da linearidade prevista na Lei de Lambert-Beer, a faixa de absorbância que os espectrofotômetros normalmente lêem com precisão varia entre 0,1 a 1, o que corresponde a uma concentração de 5 a 50 μg/mL (Brasileiro & Carneiro, 1998). A aceitação de valores de leitura muito reduzidos ou elevados pode levar a erros da estimativa da concentração, devido à falta de sensibilidade dos equipamentos ou então pelo desvio da luz provocado pela alta turbidez das amostras. Quando o valor de absorbância é muito alto ocorre um desvio na Lei de Lambert-Beer, ou seja, a relação entre a absorbância e a concentração não é mais linear (Sambrook *et al.*, 1989). Dessa forma, amostras com valores de absorbância inferiores a 0,1 foram considerados nesse trabalho como “indetectáveis” (inferior a 5 μg/mL), assim como aquelas com valores de absorbância superiores a 1,0 foram diluídas até se adequarem ao intervalo de leitura de 0,1 a 1,0. A diluição foi levada em conta posteriormente para os cálculos de rendimento e concentração.

Os resultados de rendimento em μg de DNA por 100 mg de material para as 32 matrizes testadas pelos dois diferentes métodos estão apresentados na figura 3. Os dados brutos da leitura de absorbância encontram-se no anexo 2.

De acordo com a figura 3, dezenove amostras (59,4%) apresentaram DNA quantificável, enquanto que treze (40,6%) das 32 matrizes avaliadas não renderam quantidades de DNA suficientes para serem detectadas por espectrofotometria. As 19 amostras que tiveram DNA quantificado foram: soja em grãos, farelo de soja, torta, lecitina de soja, proteína isolada de soja, proteína texturizada de soja, milho em grãos, farelo de glúten, bolo sabor artificial de baunilha, bebida a base de soja sabor original, hambúrguer vegetal sabor frango, farinha de soja, farinha de milho flocada, adoçante dietético, alimento achocolatado em pó, barra de proteína com cobertura de chocolate, ração para frango, salsicha de frango e mistura para creme de milho. Dentre as 13 amostras que não tiveram DNA detectado por espectrofotometria se encontram: óleo de soja bruto degomado, óleo de soja refinado, amido, óleo de milho bruto, óleo de milho refinado, maltodextrina, dextrose, xarope de frutose, xarope de glicose, amido de milho comercial, cobertura sabor caramelo, sorvete sabor leite condensado e margarina.

As colunas em cinza indicam o rendimento de DNA para os extratos obtidos pelo método de extração CTAB e as colunas em azul representam o rendimento de DNA das amostras submetidas à extração pelo método de coluna de sílica. Os valores estão expressos pelas médias de rendimento obtidas para a duplicata das amostras. A) amostras da categoria 1 (soja *in natura* e os produtos do seu processamento industrial); B) amostras da categoria 2 (milho *in natura* e os produtos do seu processamento industrial); C) amostras da categoria 3 (produtos acabados contendo ingredientes de milho ou soja em sua composição); D) amostras da categoria 4 (produtos acabados contendo ingredientes de milho e soja em sua composição).

Figura 3. Rendimento de DNA obtido de matrizes alimentares (em μg por 100mg de amostra).

O método CTAB superou o rendimento do método de coluna de sílica para 12 (63,2%) dentre as 19 amostras que tiveram DNA quantificado a 260nm, a saber: torta, milho em grãos, farelo de glúten, bolo sabor artificial baunilha, bebida a base de soja, farinha de milho flocada, barra de proteína com cobertura de chocolate, salsicha de frango e mistura para creme de milho. O método de coluna de sílica superou o rendimento do método CTAB para 7 (36,8%) matrizes: soja em grãos, farelo de soja, lecitina de soja, proteína isolada de soja, proteína texturizada de soja, hambúrguer vegetal sabor frango, farinha de soja e ração para frango.

Ainda dentre as 19 amostras que tiveram DNA quantificado quatro delas, torta, farelo de glúten, bolo sabor artificial baunilha e bebida a base de soja, apresentaram rendimento de DNA quantificável espectrofotometricamente somente pelo método CTAB, e duas amostras (achocolatado em pó e adoçante dietético em pó) apresentaram rendimento de DNA quantificável espectrofotometricamente somente pelo método de coluna de sílica. O DNA das demais 14 amostras pôde ser quantificado por ambos métodos.

Para as amostras da categoria 1 (soja em grãos e os produtos de seu processamento industrial), com exceção da torta, ambos métodos geraram extratos de DNA quantificáveis. O método CTAB foi mais eficiente na extração de DNA de 3 amostras, a saber: torta, proteína isolada e proteína texturizada de soja. Por sua vez, o método de coluna de sílica teve melhor desempenho para soja em grãos, farelo de soja e lecitina de soja (figura 3a).

Para as amostras da categoria 2 (milho em grãos e os produtos de seu processamento industrial), apenas milho em grãos e farelo de glúten renderam quantidades de DNA quantificáveis espectrofotometricamente por algum dos

dois métodos. Apenas o método CTAB isolou quantidade suficiente de DNA de farelo de glúten (figura 3b).

De acordo com as figuras 3a e 3b pode-se notar que pelos dois métodos de extração é possível obter maior quantidade de DNA a partir de amostras de soja e seus derivados do que a partir de milho e seus derivados. Além de não render DNA quantificável da maioria dos derivados de milho, as amostras que apresentaram algum rendimento de DNA (milho em grãos e farelo de glúten) não ultrapassaram valores de 2 µg por 100 mg de amostra, enquanto que para 5 das amostras da categoria 1, o rendimento de DNA de algumas chegou a até 5 µg por 100 mg de amostra.

Na categoria 3 (figura 3c) foi possível quantificar DNA, por algum método de extração, nas quatro matrizes que continham ingredientes de soja, a saber: bolo sabor artificial de baunilha, bebida a base de soja, hambúrguer vegetal sabor frango e farinha de soja). Para as matrizes bolo sabor artificial de baunilha e bebida a base de soja que continham farinha e extrato de soja, respectivamente, a quantificação espectrofotométrica de DNA somente foi possível em extratos obtidos pelo método CTAB. Para o alimento que continha proteína texturizada de soja (hambúrguer vegetal), o rendimento de DNA obtido pelo método de coluna de sílica superou o obtido pelo método CTAB. De acordo ainda com a figura 3c, pode-se verificar que a farinha de soja resultou num maior rendimento de DNA, quando comparada com os outros três produtos acabados da categoria 3 (bolo sabor artificial de baunilha, bebida a base de soja, hambúrguer vegetal) que contém soja como ingrediente. A farinha é constituída apenas de grãos de soja, ou seja, 100% de material contendo DNA em sua composição, enquanto que nos outros produtos

processados o DNA total encontra-se diluído em outros componentes como sal, fermento químico, bicarbonato de sódio, aromatizantes, vitaminas, estabilizantes, água, temperos, entre outros.

As análises dos produtos acabados da categoria 3 contendo apenas ingrediente de milho, tais como amido de milho comercial contendo amido e cobertura sabor caramelo contendo glicose de milho, repetiram os resultados obtidos para as matrizes da categoria 2 (figura 3b), ou seja, não apresentaram quantidades de DNA passíveis de serem quantificados por espectrofotometria. Em contrapartida, é possível detectar DNA obtido por ambos métodos de extração para a amostra de farinha de milho flocada que apresenta em sua composição 100% de grão de milho (figura 3c).

De acordo com a figura 3d, não foi possível obter DNA quantificável de duas amostras de produtos acabados da categoria 4 (sorvete sabor leite condensado e margarina). Para as outras cinco amostras, alimento achocolatado em pó, barra com cobertura de chocolate, ração para frango, salsicha de frango e mistura para creme de milho, foi possível detectar DNA por espectrofotometria, com destaque para a amostra de salsicha de frango, que apresentou rendimento superior a 5 µg de DNA para o extrato CTAB. A alta concentração de DNA na amostra de salsicha se deve, possivelmente, ao seu alto conteúdo de ingrediente de origem animal. O método de coluna de sílica foi o único a fornecer extrato de DNA quantificável espectrofotometricamente para a amostra de alimento achocolatado em pó.

4.1.2 Pureza

A quantificação por espectrofotometria pode fornecer com boa precisão a concentração de ácidos nucleicos. No entanto, exige preparações de DNA bastante puras. Os polissacarídeos, as proteínas, RNA e outros contaminantes interferem na quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria (Sambrook *et al.*, 1989).

A relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm foi usada como um indicativo da pureza do material, uma vez que soluções puras de DNA apresentam uma razão entre 1,7 e 1,9. Uma razão menor significa contaminação com proteínas; por outro lado, uma razão maior indica, usualmente, contaminação com fenol, que geralmente é utilizado na preparação de DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

O método CTAB rendeu extratos de pureza adequada (na faixa entre 1,7 e 1,9) para 7 (41%) das 17 amostras nas quais DNA foi detectado por espectrofotometria. No entanto, nove amostras (53%) tiveram valores abaixo e uma (6%) amostra apresentou valor acima do limite superior da faixa indicativa de pureza (figura 4a).

No caso do método de coluna de sílica foram obtidos extratos de pureza adequada (na faixa entre 1,7 e 1,9) para 5 (33%) das 15 amostras em que se conseguiu extrair DNA. Oito (54%) amostras ficaram abaixo da faixa de pureza desejada e 2 (13%) amostras apresentaram valor acima do limite superior da faixa indicativa de pureza (figura 4b).

(A)

(B)

A faixa laranja (razão 1,7 a 1,9) indica o intervalo de pureza preconizado para amostras puras de DNA.

Figura 4. Razão entre a leitura espectrofotométrica a 260 e 280 nm de amostras de DNA isoladas de 32 matrizes alimentares submetidas aos métodos de extração CTAB (A) e coluna de sílica (B).

Esses dados contrastam com informações do fabricante do Dneasy Plant Mini Kit® que especifica que a coluna de sílica garante completa remoção de inibidores da PCR, como polissacarídeos e proteínas, e o DNA purificado deve apresentar uma razão entre 1,7 a 1,9 a A260/A280 nm. Com base nos resultados obtidos isto pode ser verdadeiro para alguns materiais, mas não para alimentos processados.

4.2 Reação de Amplificação de DNA por PCR

4.2.1 Amplificação do gene de referência: reação de triagem

Todas as amostras foram submetidas a uma reação de amplificação do gene controle ou gene de referência, denominada de reação de triagem, baseada na utilização de um volume fixo de extrato de DNA (5µL) e com 30 ciclos de amplificação.

Foram submetidas à amplificação do gene da lectina da soja as matrizes da categoria 1 (grãos de soja *in natura* e derivados), da categoria 3 que possuíam ingrediente de soja em sua composição (bolo sabor artificial baunilha, bebida a base de soja, hambúrguer vegetal sabor frango e farinha de soja) e as amostras da categoria 4 (produtos acabados contendo ingredientes de milho e soja).

Já as matrizes da categoria 2 (grãos de milho *in natura* e derivados), da categoria 3 que possuíam ingrediente de milho em sua composição (farinha de milho flocada, amido de milho comercial, adoçante dietético em pó e cobertura sabor caramelo) e as amostras da categoria 4 (produtos acabados contendo

ingredientes de milho e soja) foram submetidas à amplificação do gene da invertase do milho.

A figura 5 indica, além dos resultados de rendimento, concentração e de pureza, já apresentados anteriormente, os resultados da reação de triagem de amplificação do gene de referência lectina da soja para as amostras da categoria 1.

Para o método CTAB, três amostras da categoria 1, farelo de soja, torta e proteína texturizada de soja, tiveram DNA amplificado na reação de triagem. Apesar de terem apresentado rendimento de DNA na análise de espectrofotometria, as amostras de soja em grãos, lecitina de soja e proteína isolada de soja não tiveram nenhum sinal de amplificação de DNA na triagem. Assim como não tiveram nenhum DNA detectado por espectrofotometria, ambos óleos de soja, bruto degomado e refinado, também não tiveram DNA amplificado na reação de PCR (figura 5).

De acordo com a figura 5, cinco amostras da categoria 1 submetidas a extração pelo método de coluna de sílica tiveram DNA amplificado na reação de triagem, a saber: soja em grãos, farelo de soja, torta, proteína isolada de soja e proteína texturizada de soja. A amostra de torta apesar de não ter tido DNA detectado por espectrofotometria, teve seu DNA amplificado na reação de triagem. Assim como observado para o método CTAB, apesar de apresentar rendimento de DNA, a amostra de lectina de soja de concentração 8µg/mL de DNA, submetida à extração pelo método de coluna de sílica, também não teve DNA amplificado na PCR de triagem. Para o método de coluna de sílica, também ambos óleos de soja, bruto e refinado, não tiveram nenhum DNA amplificado na reação de triagem de PCR.

O rendimento e a concentração foram determinados com base na leitura de absorbância a 260nm. A pureza foi estimada pela razão entre a leitura a 260 e 280 nm. Os produtos de PCR de amplificação do gene da lectina foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (10 µg/mL) após eletroforese. Os valores de rendimento, concentração e pureza estão expressos pela média dos resultados obtidos, enquanto que a eletroforese em gel de agarose apresenta as amostras em duplicata de amplificação. O asterisco indica que não foi possível detectar DNA por espectrofotometria.

Figura 5. Comparação entre rendimento, concentração, pureza de DNA e capacidade de amplificação do gene da lectina (168 pares de base) para amostras da categoria 1 submetidas aos métodos de extração: CTAB e coluna de sílica.

A figura 6 indica, além dos resultados de rendimento, concentração e pureza, os resultados da reação triagem de amplificação do gene de referência da invertase do milho para as amostras da categoria 2.

De acordo com a figura 6, pode-se notar que a amplificação de DNA na PCR de triagem repetiu o resultado da análise de rendimento para as amostras da categoria 2. Para o método CTAB, somente as amostras de milho em grãos e farelo de glúten tiveram DNA amplificado. Para o método de coluna de sílica, apenas a amostra de milho em grãos teve resultado positivo para a amplificação do gene da invertase na reação de triagem.

As amostras de óleo de milho bruto, óleo de milho refinado, amido, maltodextrina, dextrose, xarope de frutose e xarope de glicose, quando submetidas a ambos métodos de extração CTAB e coluna de sílica, não tiveram DNA do gene de referência da invertase amplificado (figura 6).

A figura 7 indica os resultados da reação de amplificação do gene controle na reação de triagem para as amostras da categoria 3. As amostras de bolo sabor artificial baunilha, bebida a base de soja, hambúrguer vegetal sabor frango e farinha de soja foram submetidas a amplificação do gene da lectina da soja (168 pares de base), enquanto que farinha de milho flocada, amido de milho comercial, adoçante dietético em pó e cobertura sabor caramelo foram submetidas a reação de amplificação do gene da invertase do milho (122 pares de base).

O rendimento e a concentração foram determinados com base na leitura de absorbância a 260nm. A pureza foi estimada pela razão entre a leitura a 260 e 280 nm. Os produtos de PCR de amplificação do gene da lectina foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (10 µg/mL) após eletroforese. Os valores de rendimento, concentração e pureza estão expressos pela média dos resultados obtidos, enquanto que a eletroforese em gel de agarose apresenta as amostras em duplicata de amplificação. O asterisco indica que não foi possível detectar DNA por espectrofotometria.

Figura 6. Comparação entre rendimento, concentração, pureza de DNA e capacidade de amplificação do gene da invertase (122 pares de base) para amostras da categoria 2 submetidas aos métodos de extração: CTAB e coluna de sílica.

O rendimento e a concentração foram determinados com base na leitura de absorbância a 260nm. A pureza foi estimada pela razão entre a leitura a 260 e 280 nm. Os produtos de PCR de amplificação dos genes da lectina e da invertase foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (10 µg/mL) após eletroforese. Os valores de rendimento, concentração e pureza estão expressos pela média dos resultados obtidos, enquanto que a eletroforese em gel de agarose apresenta as amostras em duplicata de amplificação. O asterisco indica que não foi possível detectar DNA por espectrofotometria.

Figura 7. Comparação entre rendimento, concentração, pureza de DNA e capacidade de amplificação do gene da lectina (168 pares de base) e invertase (122 pares de base) para alimentos processados contendo ingredientes de soja e milho, respectivamente e submetidos aos métodos de extração: CTAB e coluna de sílica.

Para o método CTAB, cinco das oito amostras testadas para a categoria 3 tiveram resultado positivo para a amplificação de gene de referência da reação de triagem. As amostras de bolo sabor artificial de baunilha, bebida a base de soja, hambúrguer vegetal sabor frango amplificaram o gene da lectina de soja, enquanto que as amostras de farinha de milho flocada e amido de milho comercial amplificaram o gene da invertase de milho. Ainda para o método CTAB, não houve a amplificação de gene de referência na PCR de triagem para as amostras de farinha de soja, adoçante dietético e cobertura sabor caramelo.

De acordo com a figura 7, as amostras submetidas à extração pelo método de coluna de sílica que amplificaram DNA do gene de referência foram: bolo sabor artificial de baunilha, bebida a base de soja, hambúrguer vegetal sabor frango, farinha de soja, farinha de milho flocada e amido de milho comercial. A amostra de amido de milho comercial submetido à extração pelo método de coluna de sílica teve o mesmo comportamento quando submetida à extração por CTAB. Como mostra ainda a figura 7, o extrato de DNA da amostra de hambúrguer vegetal, obtido pelo método de coluna de sílica, apresentou a amplificação de bandas inespecíficas de alto peso molecular. Assim como descrito no método CTAB, as amostras de adoçante dietético e cobertura sabor caramelo não tiveram DNA de gene de referência amplificado na PCR de triagem.

A figura 8 indica os dados de rendimento, concentração, pureza e capacidade de amplificação de DNA na reação de triagem do gene da lectina para as amostras da categoria 4.

Três dentre as sete amostras da categoria 4 tiveram o gene da lectina amplificado, a saber: barra de proteína com cobertura de chocolate, salsicha de frango e mistura para creme de milho. As amostras de alimento achocolatado em pó, sorvete sabor leite condensado, margarina e ração de frango não tiveram DNA amplificado para o alvo em questão. No caso das amostras de alimentos achocolatado em pó, sorvete sabor leite condensado e margarina, esse resultado não surpreende, uma vez que nenhum DNA foi recuperado para essas amostras, pelo método CTAB de extração.

Para o método de coluna de sílica, quatro amostras tiveram DNA amplificado, dentre elas: barra de proteína, ração para frango, salsicha de frango e mistura para creme de milho.

Um ingrediente comum às amostras de alimento achocolatado em pó, barra de proteína, sorvete sabor leite condensado e margarina foi a lecitina de soja. Adicionalmente à lecitina de soja, a amostra de barra de proteína continha ainda proteína isolada de soja declarada como ingrediente em seu rótulo e foi a única amostra, que quando submetida a ambos métodos de extração de DNA, teve o DNA-alvo amplificado.

O rendimento e a concentração foram determinados com base na leitura de absorbância a 260nm. A pureza foi estimada pela razão entre a leitura a 260 e 280 nm. Os produtos de PCR de amplificação do gene da Lectina foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (10 µg/mL) após eletroforese. As amostras foram analisadas em duplicata. Os valores de rendimento, concentração e pureza estão expressos pela média dos resultados obtidos, enquanto que a eletroforese em gel de agarose apresenta as amostras em duplicata da amplificação. O asterisco indica que não foi possível detectar DNA por espectrofotometria.

Figura 8. Comparação entre rendimento, concentração, pureza de DNA e capacidade de amplificação do gene da lectina (168 pares de base) para amostras da categoria 4 submetidas aos métodos de extração: CTAB e coluna de sílica.

Além dos resultados de rendimento, concentração e pureza, a figura 9 indica os resultados da reação de triagem da amplificação do gene de referência invertase para as amostras da categoria 4.

Apenas as amostras de ração para frango e mistura para creme de milho, submetidas a extração de DNA por ambos métodos CTAB e coluna de sílica, tiveram gene da invertase do milho amplificados. As outras cinco amostras, alimento achocolatado em pó, barra de proteína, sorvete com sabor de leite condensado, margarina e salsicha de frango não tiveram DNA alvo amplificado na reação de triagem. As amostras negativas de achocolatado em pó, barra de proteína, sabor leite condensado e margarina tinham em comum, como ingredientes declarados em seus rótulos, a presença de derivados de milho como maltodextrina, dextrose, xarope de frutose ou xarope de glicose, sugerindo novamente ser bastante limitada a detecção de DNA nesses derivados.

O rendimento e a concentração foram determinados com base na leitura de absorbância a 260nm. A pureza foi estimada pela razão entre a leitura a 260 e 280 nm. Os produtos de PCR de amplificação do gene da Lectina foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (10 µg/mL) após eletroforese. As amostras foram analisadas em duplicata. Os valores de rendimento, concentração e pureza estão expressos pela média dos resultados obtidos, enquanto que a eletroforese em gel de agarose apresenta as amostras em duplicata da amplificação. O asterisco indica que não foi possível detectar DNA por espectrofotometria.

Figura 9. Comparação entre rendimento, concentração, pureza de DNA e capacidade de amplificação do gene da invertase (122 pares de base) para amostras da categoria 4 submetidas aos métodos de extração: CTAB e coluna de sílica.

4.2.2 Amplificação do gene de referência com maior quantidade de DNA e maior número de ciclos

Tanto os extratos de DNA obtidos pelo método CTAB, como os obtidos pelo método de coluna de sílica que não amplificaram DNA na primeira reação de triagem, e cuja concentração de DNA foi inferior 20µg/mL, foram submetidos a uma segunda reação de amplificação, dessa vez com maior quantidade de DNA e um número maior de ciclos para se tentar obter algum sinal de amplificação.

Dentro desse cenário, as amostras que continham sabidamente algum ingrediente derivado de soja foram submetidas à amplificação do gene da lectina, enquanto as que continham na sua composição algum derivado de milho, foram submetidas a reação de amplificação do gene da invertase.

Nessa reação o volume de DNA para cada amostra colocado na reação foi elevado para 14µL (substituindo o total do volume de água da reação) e o número de ciclos da PCR foi aumentado para 40. Com exceção da quantidade de água na reação, todas as outras condições da reação foram idênticas ao protocolo de triagem.

A figura 10 indica a amplificação do gene da lectina (168 pares de base) para amostras de torta, lecitina de soja, óleo de soja degomado, óleo de soja refinado, hambúrguer vegetal sabor frango, alimento achocolatado em pó, sorvete sabor leite condensado e margarina. Os extratos das amostras de lecitina de soja e alimento achocolatado em pó obtidos pelo método CTAB e coluna de sílica, quando submetidos a uma outra reação de PCR com maior adição de DNA e 40 ciclos de PCR, apresentaram sinal positivo para a amplificação do gene da lectina.

As partes superior e inferior da figura indicam, respectivamente, as amostras que foram submetidas à extração de DNA pelo método CTAB e coluna de sílica. As amostras foram analisadas em duplicata de amplificação foram analisadas as amostras de DNA de torta e hambúrguer vegetal sabor frango, extraídos somente pelo método de coluna de sílica.

Figura 10. Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (10 µg/mL) das reações de amplificação do gene da lectina (168 pares de base) para amostras das categorias 1, 3 e 4 submetidas a dois métodos de extração que apresentaram resultado negativo na reação de triagem e que renderam quantidades de DNA inferiores a 20µg/ mL de DNA. A reação de PCR foi realizada com maior quantidade de DNA e 40 ciclos.

Um resultado positivo também foi observado para os extratos de torta e hambúrguer vegetal sabor frango, obtidos pelo método de coluna de sílica. As amostras de óleo de soja degomado, óleo de soja refinado, sorvete sabor leite condensado e margarina mantiveram o resultado negativo, mesmo após a PCR com maior quantidade de DNA e número de ciclos (figura 10).

Dos 13 extratos de amostra obtidos pelo método CTAB e coluna de sílica submetidos à reação de amplificação do gene de referência da invertase com maior entrada de DNA e 40 ciclos, apenas a amostras de amido apresentou resultado positivo. As outras amostras de maltodextrina, dextrose, xarope de frutose, óleo de milho bruto, óleo de milho refinado, farelo de glúten, xarope de glicose, adoçante dietético em pó, cobertura de caramelo, alimentos achocolatado em pó, barra de proteína com cobertura de chocolate, sorvete sabor leite condensado e margarina tiveram resultado negativo para essa amplificação. O extrato de farelo de glúten obtido pelo método de coluna de sílica apresentou resultado positivo para amplificação do gene da invertase quando submetido a uma PCR com maior número de ciclos e maior entrada de DNA (figura 11).

As partes superior e inferior da figura indicam respectivamente as amostras que foram submetidas à extração de DNA pelo método CTAB e coluna de sílica. As amostras foram analisadas em duplicata de amplificação.

Figura 11. Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (10 µg/mL) de produtos da amplificação do gene da invertase (122 pares de base) para amostras das categorias 2, 3 e 4 submetidas a dois métodos de extração que apresentaram resultado negativo na reação de triagem e que renderam quantidades de DNA inferiores a 20µg/ mL de DNA. A reação de PCR foi realizada com maior quantidade de DNA e 40 ciclos.

4.2.3 Amplificação do gene de referência com menor quantidade de DNA

Os extratos obtidos pelo método CTAB que sabidamente continham ingrediente de soja na composição e que não amplificaram DNA na reação de triagem do gene da lectina e cuja concentração de DNA foi superior a 20µg/mL (soja em grãos, proteína isolada de soja, farinha de soja e ração para frango) foram submetidos a uma terceira reação de amplificação do gene da lectina.

Nessa reação o volume de DNA para cada amostra colocado na reação foi 5µL, contudo os extratos de DNA foram diluídos 10 e 100 vezes em tampão de eluição. O número de ciclos da reação de PCR foi de 30 e todas as outras condições da reação foram idênticas ao protocolo descrito anteriormente na reação de triagem.

A figura 12 indica a amplificação do gene da lectina (168 pares de base) nas condições citadas anteriormente para as amostras de soja em grãos, proteína isolada de soja, farinha de soja e ração para frango, obtidos pelo método CTAB de extração de DNA. De acordo com a figura, todas as quatro amostras, com exceção da réplica A das amostras de farinha de soja, mantiveram o resultado negativo para a amplificação do gene da lectina quando seus extratos não diluídos foram submetidos a PCR. Em contrapartida, resultados positivos foram obtidos quando esses mesmos extratos foram diluídos 10 e 100 vezes.

As letras A e B indicam as duplicatas das amostras que foram submetidas à amplificação.

Figura 12. Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (10 $\mu\text{g/mL}$) da reação de amplificação do gene da lectina (168 pares de base) para amostras sem diluição (s.d.) e diluídas 10 (10^{-1}) e 100 (10^{-2}) vezes das categorias 1 e 4 submetidas ao método CTAB de extração que apresentaram resultado negativo na reação de triagem e que renderam quantidades de DNA superiores a 20 $\mu\text{g/mL}$ de DNA.

A figura 13 indica os resultados da amplificação do gene da invertase para os extratos diluídos e não-diluídos de salsicha de frango e ração para frango obtidos pelo método de coluna de sílica e para o extrato de salsicha de frango obtido pelo método CTAB. O desaparecimento do *smear* de DNA, observado para o extrato não diluído de ração de frango, pode ser visto para as amostras diluídas. No caso dos extratos de salsicha de frango, o efeito de *smear* também foi minimizado com as diluições, contudo nenhum sinal de amplificação do gene da invertase pode ser visualizado.

A tabela 3 sumariza os dados gerais das reações de amplificação. Das 32 amostras analisadas pela reação de PCR convencional, foi possível amplificar DNA de milho ou soja em 20 (62,5%) amostras. Doze amostras não tiveram resultado de PCR positivo para ambos os métodos.

As duplicatas das amostras que foram submetidas a amplificação estão indicadas pelas letras A e B. Reações de amplificação do gene da invertase (122 pares de base) para amostras sem diluição (s.d) e diluídas 10 (10^{-1}) e 100 (10^{-2}) vezes da categoria 4, submetidas a dois métodos de extração (1 – coluna de sílica; 2 – CTAB), que apresentaram resultado negativo na reação de triagem e que renderam quantidades de DNA superiores a 20 $\mu\text{g/mL}$ de DNA.

Figura 13. Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (10 $\mu\text{g/mL}$) das para o gene da invertase para amostras sem diluição (s.d.) e diluídas.

Tabela 3. Resultados da amplificação do gene da lectina ou da invertase para as 32 matrizes alimentares avaliadas neste estudo.

Material testado	Resultado da PCR do gene de referência	
	CTAB	Coluna de Sílica
Soja em grãos	+	+
Farelo de soja	+	+
Torta	+	+
Lecitina de soja	+	+
Óleo de soja bruto degomado	-	-
Óleo de soja refinado	-	-
Proteína isolada de soja	+	+
Proteína texturizada de soja	+	+
Milho em grãos	+	+
Amido	+	+
Óleo de milho bruto	-	-
Óleo de milho refinado	-	-
Maltodextrina	-	-
Dextrose	-	-
Xarope de frutose	-	-
Xarope de glicose	-	-
Farelo de glúten	+	+
Bolo Sabor artificial de baunilha	+	+
Bebida a base de soja sabor original	+	+
Hambúrguer vegetal sabor frango	+	+
Farinha de soja	+	+
Farinha de milho flocada	+	+
Amido de milho comercial	+	+
Adoçante dietético em pó	-	-
Cobertura sabor caramelo	-	-
Alimentado achocolatado em pó	+ ^a	+ ^a
Barra de proteína com cobertura de chocolate	+ ^a	+ ^a
Sorvete sabor leite condensado	-	-
Margarina	-	-
Ração para frango	+	+ ⁱ
Salsicha de frango	+ ^a	+ ^a
Mistura para creme de miho	+ ^b	+ ^b

^a positivo somente para o gene da lectina, ^b positivo para gene da lectina e invertase

4.3 Reação de amplificação de DNA por PCR em tempo real

As vinte amostras que tiveram DNA amplificado pela técnica de PCR convencional foram submetidas a uma reação de amplificação do gene controle pela técnica de PCR em tempo real utilizando-se uma entrada de DNA de aproximadamente 100ng e com 45 ciclos de amplificação.

Foram submetidas à amplificação pela PCR em tempo real do gene da lectina da soja as matrizes da categoria 1 (soja em grãos, farelo de soja, torta, lecitina de soja, proteína isolada de soja e proteína texturizada de soja), da categoria 3 que possuíam ingrediente de soja em sua composição (bolo sabor artificial baunilha, bebida a base de soja, hambúrguer vegetal sabor frango e farinha de soja) e as amostras da categoria 4, contendo ingredientes de milho e soja (alimentos achocolatado em pó, barra de proteína com cobertura de chocolate, ração para frango, salsicha de frango e mistura para creme de milho).

Já as matrizes da categoria 2 (milho em grãos, amido e farelo de glúten), da categoria 3 que possuíam ingrediente de milho em sua composição (farinha de milho flocada e amido de milho comercial) e a amostra da categoria 4, contendo ingredientes de milho e soja (mistura para creme de milho) foram submetidas à amplificação pela PCR em tempo real do gene da invertase do milho.

A figura 14 indica os Ct obtidos pela amplificação em tempo real da amplificação dos genes de referência para as vinte amostras mencionadas anteriormente. A tabela contendo os valores médios de Ct encontra-se em anexo (anexo 3).

As colunas em amarelo indicam o Ct de amplificação para os extratos de DNA obtidos pelo método de extração CTAB e as colunas em azul representam o Ct de amplificação de DNA para amostras submetidas à extração pelo método de coluna de sílica. Os valores estão expressos pelas médias de Ct obtidas para a duplicata das amostras.

Figura 14. Valores de Ct obtido pela amplificação de DNA em tempo real do gene da lectina ou da invertase para as 20 matrizes alimentares que obtiveram amplificação do gene de referência pelo PCR convencional.

Todas as amostras da categoria 1, soja em grãos, farelo de soja, torta, lecitina de soja, proteína isolada de soja e proteína texturizada de soja, tiveram DNA amplificado na reação de PCR em tempo real. Com exceção da amostra de proteína texturizada de soja, os valores de Ct obtidos para as amostras da categoria 1 para os dois métodos de extração de DNA foram comparáveis (figura 14), como indicado pelos valores de delta Ct ($Ct_{CTAB} - Ct_{coluna\ de\ sílica}$) próximos de zero para essas amostras. Para a amostra de proteína texturizada de soja, o valor do delta Ct foi de 3,26, ou seja, a amostra cujo DNA foi extraído pelo método de coluna de sílica precisou de mais de 3 ciclos de amplificação para apresentar sinal significativo de fluorescência acima do sinal de base, quando comparado com o extrato CTAB de proteína texturizada de soja.

As amostras de lecitina de soja e de proteína texturizada de soja apresentaram valores de Ct acima de 25 ciclos, enquanto que as demais amostras da categoria 1 tiveram seus Ct em torno de 21 e 22 ciclos (figura 14).

Para as amostras da categoria 2 (milho em grãos, amido e farelo de glúten), uma grande variação de Ct, superior a 4 ciclos, foi observada entre os dois extratos de milho em grãos. Para a amostra de farelo de glúten, não houve sinal de amplificação para o extrato obtido pelo método de coluna de sílica. Já para a amostra de amido, os dois extratos apresentaram Ct semelhantes em torno de 22 ciclos.

Enquanto que para as amostras das categorias 1 e 2 a médias dos valores de Ct foi de 22,85 ciclos para extratos CTAB e 23,85 para extratos obtidos pelo método de coluna de sílica, para as amostras das categorias 3 e 4

esse média foi superior. Para os extratos CTAB o valor médio de Ct foi de aproximadamente mais 3 ciclos (25,77) e para os extratos obtidos pelo método de coluna de sílica o Ct médio foi de quase 5 ciclos a mais (28,96).

De acordo com a figura 4, para as categorias 3 e 4, nota-se ainda grande variação de Ct entre os extratos de uma mesma amostra obtidos pelos dois métodos de purificação de DNA. No caso de amostras como hambúrguer vegetal sabor frango e salsicha de frango, o delta Ct foi superior a 10 ciclos (13,39 e 12,14, respectivamente).

Ainda analisando a categoria 3 e 4, extratos obtidos pelo método da coluna de sílica de quatro amostras, bebida a base de soja sabor original, farinha de milho flocada, alimentado achocolatado em pó e ração para frango não apresentaram sinal de amplificação pela técnica de PCR em tempo real.

Para 8 amostras, proteína texturizada de soja, bolo Sabor artificial de baunilha, hambúrguer vegetal sabor frango, amido de milho comercial, barra de proteína com cobertura de chocolate, salsicha de frango e mistura para creme de milho (amplificação do gene da invertase), o Ct dos extratos de coluna de sílica de DNA foi superior ao Ct dos extratos CTAB. Para 6 amostras, soja em grãos, farelo de soja, torta, lecitina de soja, proteína isolada de soja e amido, o delta Ct entre os dois extratos foi inferior a 1. Para as amostras farinha de soja e mistura para creme de milho (amplificação do gene da lectina) o Ct dos extratos CTAB foi superior ao Ct dos extratos obtidos pelo método de coluna de sílica. Para 5 amostras, farelo de glúten, bebida a base de soja sabor original, farinha de milho flocada, alimento achocolatado em pó e ração para frango, não houve sinal de amplificação de DNA para o método de coluna de sílica.

5. DISCUSSÃO

5.1 Alvos de detecção

Os materiais objeto de análise neste trabalho - soja e milho - foram selecionados com base no *status* de aprovação legal dos eventos derivados de biotecnologia no país e também pela importância e aplicação dessas espécies vegetais na indústria de alimentos.

Apesar de hoje, no Brasil, existir a aprovação legal para plantio e comercialização de duas variedades geneticamente modificadas, a soja Roundup Ready® e o algodão Bollgard® (ambos da empresa Monsanto), apenas a soja foi escolhida dentre esse grupo. A justificativa para a exclusão da variedade Bollgard, também conhecida por Bt, resistente a insetos, foi a restrição do uso do algodão na cadeia alimentar, uma vez que a maior finalidade na produção de algodão é atender a indústria têxtil e há apenas um pequeno uso em nutrição animal. Sendo assim, uma vez que o objetivo do trabalho é avaliar as metodologias frente a uma maior diversidade de matrizes, a inclusão do algodão seria uma contribuição pouco relevante.

Por outro lado, o milho foi avaliado, pois apesar de não existir até o momento aprovação pela CTNBio para plantio e comercialização de nenhum evento de milho geneticamente modificado, a importação de milho GM para suprir demandas internas já é uma realidade. Em março de 2005, amparada no argumento do possível desabastecimento no país, a Comissão Técnica

Nacional de Biossegurança autorizou através de extrato de parecer técnico número 530/05 a importação de 370 mil toneladas de milho transgênico da Argentina para garantir a ração de frangos produzidos em Pernambuco. A pedido da associação dos avicultores do Estado, que havia feito solicitação idêntica em 2003, a CTNBio permitiu a compra externa de todas as variedades geneticamente modificadas, à exceção do milho Star Link, então produzido pela Aventis, empresa adquirida pela alemã Bayer CropScience. Dessa forma, a detecção de milho é importante para garantir a entrada no país apenas de eventos autorizados para importação e, num futuro próximo, para garantir a identificação na cadeia alimentar de variedades geneticamente modificadas liberadas para cultivo e consumo no país.

5.2 Quantificação e capacidade de amplificação de DNA

A primeira reação de amplificação do gene controle foi realizada com volumes fixos de extrato independente da suposta concentração de DNA presente na amostra. O volume de 5 μ L foi estabelecido para garantir uma adição de pelo menos 25 a 250ng de DNA, de modo a cobrir o intervalo de linearidade de 0,1 a 1,0 de leitura de densidade ótica. A quantificação espectrofotométrica não foi utilizada como base nos cálculos exatos de entrada de DNA na reação de PCR, uma vez que a técnica de PCR pode fornecer resultados positivos ainda que a espectrofotometria não seja capaz de quantificar o DNA presente na amostra.

De maneira geral, computando-se todas as reações de PCR, foi possível detectar DNA de milho ou soja em 20 (62,5%) das 32 amostras. As 12

amostras que não tiveram resultado de PCR positivo para ambos os métodos foram: óleo de soja bruto de soja, óleo de soja refinado de soja, óleo bruto de milho, óleo refinado de milho, maltodextrose, dextrose, xarope de frutose, xarope de glicose, adoçante dietético em pó, cobertura de caramelo, sorvete e margarina (tabela 3). Dentre as vinte amostras positivas, uma grande diferença de perfil de rendimento, razão a 260/280nm e capacidade de amplificação de DNA foi encontrada entre os alimentos das várias categorias.

Independentemente do método de extração, foi possível detectar DNA em um maior número de amostras da categoria 1 do que da categoria 2. Como consequência, o sucesso na detecção de DNA nos alimentos das categorias 3 e 4 dependeu da fração do processamento da soja ou milho que estava presente nesses alimentos. Os alimentos processados contendo derivados de soja como lecitina de soja, isolados protéicos e farelos, assim como os contendo derivados de milho como farelo de milho e glúten, puderam ser analisados para a presença de DNA do gene de referência.

Para as categorias 1 e 2, o tipo de fração e de processamento ao qual essas frações foram submetidas influenciaram no rendimento e na capacidade de amplificação de DNA extraído. Não houve rendimento e amplificação de DNA por nenhum dos métodos tanto para o óleo de soja bruto, como para o óleo de soja refinado, assim como não foi possível quantificar DNA nos seguintes derivados de milho: óleo de milho bruto e refinado, maltodextrina, dextrose, xarope de alta frutose e xarope de glicose.

Observando-se o processamento industrial da soja e do milho, pode-se verificar que é durante a obtenção dos derivados de amido, óleos, lecitinas e

isolados protéicos que ocorrem os tratamentos mais drásticos. Altas temperaturas, alta pressão, digestão enzimática, hidrólise, tratamentos com soluções alcalinas e ácidas, centrifugação são processos industriais que podem fragmentar, destruir ou eliminar por completo o DNA alvo da matriz alimentar.

No entanto, é curioso que, para os óleos de soja bruto e refinado e derivados de amido (maltodextrina, xarope de frutose, xarope de glicose e dextrose), o rendimento e a amplificação de DNA obtido pelos dois métodos não foram possíveis, enquanto que para isolados protéicos (proteína isolada de soja e texturizada), lecitina de soja e amidos industrial e comercial o efeito do processamento pareceu não ser tão crítico, permitindo resultados positivos de amplificação do gene de referência.

Um ponto a ser considerado no caso das proteínas isoladas e da lecitina é que talvez o conteúdo inicial de DNA no farelo de soja (que dá origem aos isolados protéicos) seja maior do que aquele encontrado no endosperma e germe do milho e no próprio óleo bruto tanto de soja quanto de milho. Nesse caso, é possível que frações com alto conteúdo oleoso (e aqui vale lembrar que o germe é composto de 50% de óleo) e/ou ricas em amido contenham uma menor quantidade de DNA em relação a aquelas com maior conteúdo protéico (farelos de soja, torta e isolados protéicos).

Com relação ao resultado para o amido, é provável que a baixa quantidade de DNA já normalmente existente nessa amostra tenha sido removida nas etapas de processamento e dessa forma seus derivados como maltodextrina, dextrose, xarope de frutose e xarope de glicose não

apresentaram resultado positivo para a amplificação do gene de referência. No caso do amido comercial, a amplificação de DNA já na reação de triagem pode sugerir contaminação com outros derivados de milho (farinha) ao longo de sua industrialização.

Os resultados obtidos nesse trabalho para óleos concordam com dados da literatura (Pauli *et al.*, 1998; Gryson *et al.*, 2002), os quais indicam que nenhum material genético pode ser recuperado após a primeira etapa do processamento do óleo de soja (quando o óleo ainda não refinado é centrifugado). De acordo com os autores desses trabalhos, através da reação de *nested* PCR para amplificação do gene controle lectina é possível ver que a etapa de centrifugação para obtenção do óleo refinado elimina praticamente todo o material genético do óleo. Em função desses dados, países como a Suíça, por exemplo, concluem que, em relação à presença de OGM, óleo de soja feito a partir de soja geneticamente modificada é idêntico ao óleo tradicional e não precisam ser rotulados como produto geneticamente modificado. Contudo, para derivados de milho, nenhum estudo dessa natureza foi anteriormente reportado.

Em comum ao grupo de amostras das categorias 3 e 4, nas quais foi possível detectar DNA, está a presença de frações de isolados e concentrados protéicos de soja ou ainda de farelos de milho, soja e farelo de glúten refletindo os resultados encontrados individualmente para essas frações (figuras 3a e 3b), de que foi possível recuperar DNA por pelo menos um método de extração. Para essas amostras especificamente, o fator de diluição dos ingredientes, assim como a maior complexidade da matriz, pareceram não ser aspectos limitantes para a extração.

As amostras de produtos acabados das categorias 3 e 4 que não tiveram DNA quantificado apresentavam em sua composição maltodextrina, lecitina de soja, amido e seus derivados, óleo vegetais, sugerindo novamente que frações com alto conteúdo de óleos e ricas em amido possuem uma menor quantidade de DNA em relação a aquelas com maior conteúdo protéico, como farelos de soja, torta e isolados protéicos. Nesse caso, é importante destacar também que a lecitina de soja pode render quantidades de DNA quando analisada como fração isolada, mas quando “diluída” numa matriz de produto acabado ou então quando submetida a efeitos adicionais de processamento, como no caso da margarina e sorvete sabor leite condensado, nem o método de PCR foi sensível o suficiente para detectar o DNA-alvo.

Independente do método de extração, a amostra de lecitina de soja com concentração inferior a 10µg/mL e com razão a 260/280nm de 1,3, somente rendeu resultado positivo para a amplificação do gene controle após ser submetida a uma reação de PCR com maior adição de DNA e aumento do número de ciclos (40 ciclos). Seguindo o mesmo perfil, a amostra de alimento achocolatado em pó, que apresentou nenhum (método CTAB) ou baixo rendimento de DNA (coluna de sílica) após maior adição de DNA e número de ciclos, permitiu a obtenção de resultado positivo para a amplificação do gene-controle, reforçando o fato de que um resultado pouco satisfatório na quantificação espectrofotométrica não necessariamente significa um resultado negativo na reação de PCR (figura 10).

A amostra de amido de milho comercial que não apresentou nenhum rendimento e pureza de DNA, para ambos métodos de extração, gerou resultado positivo para a amplificação do gene da invertase do milho logo na

reação de triagem, indicando que o método de quantificação por espectrofotometria não é sensível o bastante para matrizes contendo níveis muito baixos de DNA e, dessa forma, a técnica de PCR acaba sendo imprescindível para a adequada detecção de quantidades mínimas de DNA (figura 7).

As amostras de bolo sabor artificial de baunilha e bebida a base de soja, submetidas a extração de DNA pelo método de coluna de sílica, não apresentaram nenhum rendimento e pureza de DNA, mas geraram resultados positivos para a amplificação do gene controle, novamente tocando na questão da limitação da sensibilidade da espectrofotometria para a quantificação de DNA (figura 7).

Algumas amostras com concentração superior a 40ng/ μ L e pureza entre 1,7 e 1,9 precisaram ser diluídas pelo menos 10 vezes para se chegar a um resultado positivo de amplificação, pelo menos para um dos genes controle. São elas as amostras de soja em grãos (concentração de DNA superior a 40 μ g /mL), proteína isolada de soja (concentração de DNA superior a 100 μ g /mL), farinha de soja (concentração de DNA superior a 100 μ g /mL) e ração para frango (concentração de DNA superior a 60 μ g /mL) (figuras 12 e 13). É possível considerar que as para essas amostras as reações de amplificação não tenham tido sucesso por adição de excesso de DNA.

Algumas possíveis limitações do método de coluna de sílica podem ter sido responsáveis pelo seu pior desempenho com relação à detecção por espectrofotometria de DNA. O método de coluna de sílica de DNA pode ter sofrido maior efeito de matrizes com alto conteúdo de polissacarídeo do que o

método CTAB, uma vez que já foi reportado (Hubner *et al.*, 2001) que polissacarídeos tendem a se ligar às colunas de sílica afetando a eficiência da separação e conseqüentemente o rendimento da extração. De fato, as amostras de torta e milho em grãos têm alto conteúdo de polissacarídeos.

Para o método de coluna de sílica, o valor de concentração de 12 µg/mL, assim como a razão entre a leitura a 260 e 280 nm de 1,3, juntamente com o resultado negativo de amplificação do gene de referência para a amostra de adoçante dietético, podem sugerir contaminação do suposto extrato de DNA dessa matriz com polissacarídeos.

Através de ambos métodos de extração, foi possível obter maior quantidade de DNA a partir de amostras de soja e seus derivados do que de milho e seus derivados. De fato, a menor proporção de DNA em relação à massa celular do grão do milho parece afetar o rendimento de DNA dessa matriz e de seus derivados. Sabe-se que as principais partes que compõe um grão de milho são o germe e o endosperma, sendo que este último responde por aproximadamente 80 a 90% do total do peso de grão. Um estudo de Trifa e Zhang (2004) mostrou que o endosperma pode apresentar um conteúdo de DNA até 25 vezes menor que o germe, sugerindo que o DNA do milho encontra-se concentrado na menor porção do milho, ou seja, no germe.

5.3 Estratégia de amplificação

Os resultados mostram que a classificação com base na tentativa de estabelecer metodologias mais adequadas para determinadas classes ou

categorias de alimentos definidas com base nos tipos de frações (soja e derivados, milho e derivados, produtos processados com ingrediente de milho e ou soja), não permitiu determinar nenhuma semelhança ou tendência entre os grupos ou categorias para os parâmetros avaliados nesse estudo. Ou seja, não foi possível definir uma estratégia mais adequada a cada tipo de classe de matrizes, uma vez que dentro de uma mesma categoria, as amostras tiveram padrões bastante distintos de rendimento, pureza e capacidade de amplificação. Por outro lado, a avaliação do perfil individual de rendimento e capacidade de amplificação na reação de triagem permitiu delinear uma estratégia de amplificação para as amostras, como discutido a seguir.

Apesar de não ser um método sensível e específico, a quantificação espectrofotométrica dos extratos de DNA pode ser uma ferramenta importante na orientação da estratégia de amplificação de DNA, independentemente da categoria, definida neste trabalho, a que ele pertence. A avaliação caso-a-caso do perfil conjunto de rendimento e capacidade de amplificação na reação de triagem pode direcionar os parâmetros da PCR a ser empregada para cada matriz.

De maneira geral, quando a amplificação não ocorre na reação de triagem, se a quantidade de DNA inserido na reação de PCR for inferior a aproximadamente 20ng/ μ L, a reação deve ser repetida com maior quantidade de DNA e o número de ciclos deve ser aumentado para se tentar alcançar maior sinal de amplificação. Quando a amplificação não ocorre, e a quantidade de DNA for superior a 40 ng/ μ L, o extrato de DNA deve ser diluído numa ordem de 10 a 100 vezes.

No caso das amostras que não tem DNA quantificável por espectrofotometria, a reação de PCR pode ser positiva, indicando baixa sensibilidade do método de quantificação espectrofotométrica. No caso de insucesso na PCR inicial, a reação deve ser repetida com maior quantidade de DNA e o número de ciclos deve ser aumentado para se tentar alcançar maior sinal de amplificação. Nesse caso, as análises de amostras contendo frações menos processadas de soja e milho poderão ser bem-sucedidas.

5.4 PCR em tempo real

A diferença de Ct entre amostras ($\Delta Ct = Ct \text{ amostra a} - Ct \text{ amostra b}$) pode indicar a razão entre as quantidades iniciais de DNA de amostras. Um ΔCt de 1 ciclo entre duas amostras indica uma razão de 2, ou seja, que a quantidade inicial de DNA da amostra cujo Ct tem o menor valor é o dobro da outra ($2^{(\Delta Ct)} = 2^1 = 2$).

Dessa forma, diferentemente da PCR convencional, que fornece um resultado visual do ponto final da reação (presença ou ausência do produto de PCR amplificado) a PCR em tempo real permite, além da visualização da curva de amplificação, a obtenção de valores numéricos de Ct, ou seja, do primeiro ciclo onde o sistema diferencia o sinal de amplificação do ruído da reação. Para se poder comparar dos valores de Ct obtidos para as diferentes amostras analisadas, padronizou-se a entrada de DNA na reação de PCR em tempo real em torno de 100ng. Para isso, os valores de quantificação espectrofotométrica de DNA foram levados em consideração e os extratos de DNA foram diluídos para uma concentração aproximada de 10ng/ μL .

A diferença de mais de 3 ciclos notada para os diferentes extratos de proteína texturizada de soja significa, teoricamente, que a quantidade inicial de DNA para o extrato da coluna de sílica da amostra era 8 (2^3) vezes menor do que a quantidade de DNA para o extrato CTAB. Se as amostras tiveram o DNA diluído para a concentração de 10ng/ μ L essa diferença não deveria ser tão significativa. O valor de delta Ct para a amostra de proteína texturizada de soja deveria também ser próximo de zero como acontece para as outras amostras da categoria 1.

A diferença de Ct encontrada entre as vinte amostras, e mesmo entre os dois diferentes extratos para uma mesma amostra, sugere que características intrínsecas de cada matriz e/ou do método de extração podem influenciar na reação de amplificação pela PCR em tempo real. A normalização da entrada de DNA parece não significar diretamente que os valores de Ct de amostras diferentes são comparáveis. Se considerarmos que o erro na quantificação espectrofotométrica fosse a única fonte de tais diferenças de Ct, as diferenças de até mais de 10 ciclos de amplificação para algumas amostras (ex: salsicha de frango e hambúrguer vegetal sabor frango) sugeririam que a quantificação espectrofotométrica teria um erro extremamente elevado superior a 1000 vezes (2^{10}).

Os altos valores de Ct observados para amostras da categoria 4 (alimento achocolatado em pó, barra de proteína, ração para frango, hambúrguer vegetal sabor frango e mistura para creme de milho) sugerem que o processamento dos alimentos pode ter impacto no perfil de amplificação do DNA. A fragmentação do DNA durante o processamento dos alimentos pode ser crítica para a amplificação por PCR em tempo real e conseqüentemente

para a quantificação de ingredientes transgênicos nessa categoria de alimentos.

A não-amplificação dos extratos de DNA obtidos pelo método de coluna de sílica para as amostras de farelo de glúten, bebida a base de soja sabor original, farinha de milho flocada, alimentado achocolatado em pó e ração para frango sugerem ainda que o método de extração de DNA utilizado pode ser determinante no caso de algumas matrizes para o sucesso da amplificação pela técnica de PCR em tempo real.

6. CONCLUSÃO

Para a técnica de PCR convencional, não houve melhor adequação de um ou outro protocolo de extração para classe ou categorias de produtos. Ambos os métodos, CTAB e coluna de sílica tiveram desempenho comparável para as 32 matrizes avaliadas nesse estudo. Nesse caso, a escolha do método de extração de DNA deve recair sobre a análise do seu custo e da sua rapidez. O método CTAB apesar de ter custo inferior leva em torno de 8 horas para ser realizado. O método de coluna de sílica, por sua vez, apresenta custo mais elevado, mas pode ser executado em até 1,5 horas, dependendo do número de amostras.

A técnica de PCR em tempo real se mostrou mais sensível à qualidade do DNA testado. O processamento de alimentos parece interferir na capacidade de amplificação do DNA e a escolha do método de extração pode ser determinante para o sucesso da amplificação por essa técnica. Nesse contexto, o método CTAB se mostrou mais eficiente do que o método de coluna de sílica.

Independentemente do método de extração utilizado não foi possível detectar DNA dos genes de referência nas frações de óleos de soja e milho e em derivados de amido como maltodextrina, dextrose, xarope de frutose e xarope de glicose.

Os resultados sugerem que a aplicabilidade da lei de rotulagem pode esbarrar num entrave técnico no caso de algumas matrizes alimentares altamente processadas. A legislação de rotulagem poderia se adequar a limitações técnicas existentes e sustentar a presença de uma lista “negativa” de alimentos não passíveis de serem analisados para a presença de DNA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLMANN, M.; CANDRIAN, U.; LÜTHY, J. Detection of wheat-contamination in dietary non-wheat products by PCR. **Lancet**, v.339, 1992.

ALLMANN, M.; CANDRIAN, U.; HÖFELEIN, C.; LÜTHY, J. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food: Detection of wheat-contamination in non-wheat food products. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, v.196, p. 248-251, 1993.

AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION. Soy Stats: A reference Guide to Important soybean facts and figures. **American Soybean Association**, St. Louis, MO., 1999.

ANDERSON, R. A.; WATSON, S. A. The corn milling industry. **Handbook of Processing and Utilization in Agriculture**, Boca Raton, Florida, v.II, p. 31 – 78, 1982.

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

BAUER T.; WELLER P.; HAMMES W. P.; HERTEL C. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. **Eur. Food Research and Technol**, v.27, n.4, p. 338 – 343, 2003.

BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurada pela Lei 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24/04/03, 2003.

BRASIL. Lei de Biossegurança 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24/03/05, 2005.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds.) Manual de Transformação Genética de Plantas. EMBRAPA, Brasília, 1998.

CAMPBELL, M. R.; POLLAK, L. M.; WHITE, P. J. Genetic Variation for Starch Thermal and Functional Properties Among Nonmutant Maize Inbreds. **Cereal Chemistry**, v.72, n.3, p. 281-286, 1995.

CARPENTER, J. E. Comparing Roundup Ready and Conventional Soybean Yields 1999. **National Center for Food and Agricultural Policy**, Washington, DC, January 2001. Disponível em: < <http://www.ncfap.org/pubs.htm> >. Acesso em: dez. 2005.

CORBISIER, P.; TRAPMANN, S.; GANCBERG, D.; HANNES, L.; VAN IWAARDEN, P.; BERBEN, G.; SCHIMMEL, H.; EMONS, H. Quantitative determination of Roundup Ready soybean (*Glycine max*) extracted from highly processed flour. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 383, p. 282-290, 2005.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, p. 19-21, 1983.

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** v.12, p. 13-15, 1990.

EBBEHOJ, K. F.; THOMSEN, P. D. Differentiation of closely related species by DNA hybridization. **Meat Sci.**, v.30, p. 359-366, 1991.

ECKHOFF, S. R; PAULSEN, M. R. **Maize. In: Cereal Grain Quality**, Chapman and Hall, London, U.K., p. 77-112, 1996.

EUROPEAN UNION. Commission Directive (EC) 49/2000 of 10 Jan 2000 amending Council Regulation (EC) 1139/98 concerning the compulsory indication on the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. **Off. J. Eur. Communities**, L 006, p. 13-14, 2000.

EUROPEAN UNION. Commission Directive (EC) 50/2000 of 10 Jan 2000 on the labelling of foodstuffs and food ingredients containing additives and flavourings that have been genetically modified or have been produced from genetically modified organisms. **Off. J. Eur. Communities**, L 006, p. 15-17, 2000.

EUROPEAN UNION. Commission Directive (EC) 641/2004 of 6 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. **Off. J. Eur. Communities**, L 102, p. 14, 2004.

FERNANDES - CORNEJO, J.; MCBRIDE, W. D. Agricultural Economic Report. **USDA**, Washington, DC, n. 810, May 2002. Disponível em: < <http://www.ers.usda.gov/publications/aer810/> >. Acesso em: dez 2005.

GACHET, E.; MARTIN, G. G.; VIGNEAU, F.; MEYER, G. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief reviews of methodologies available. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p. 380-388, 1999.

GASCH, A.; WILBORN, F.; SCHEU, P.; BERGHOF, K. Detection of genetically modified organisms with the polymerase chain reaction: potential problems with food matrices. **BgVV**, In Food Produced by Modern Genetic *engineering* 2nd Status Report, p. 90-97, 1997.

GRYSON, N.; RONSSE F.; MESSENS, K.; DE LOOSE, M.; VERLEYEN, T.; DEWETTINCK, K. Detection of DNA During the Refining of Soybean Oil. **JAOCs**, v.79, n.2, p 171-174, 2002.

HEMMER, W. Food derived from genetically modified organisms and detection methods. **Center BATS in collaboration with the Swiss Federal Office of Public Health**, August, 1997. Disponível em: < http://www.bats.ch/bats/publikationen/1997-2_gmo/index.php >. Acesso em: out. 2005.

HODGE, J.E. Food and feed uses of corn. In **CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture. Plant Products**. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL U.S.A, v.II, p. 79-87, 1982.

HOLST-JENSEN, A. Identification and characterization of suitable species-specific reference–genes, and development of reference –gene specific primers-probe sets for qualitative and quantitative PCR amplification and detection. **European Commission**, Oslo, NO, March 1999. Disponível em: < <http://www.vetinst.no/Qpcrgmfood/ Qpcrgmfood.htm> >. Acesso em: out 2005.

HINO, A. Development of detection method for monitoring of GM foods in Japan. **National Food Research Institute**, January 2002.

HUBNER, P.; WAIBLINGER, H. U.; PIETSCH, K.; BRODMANN, P. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. **J. AOAC Int.**, v.84, n.6, p.1855-1864, 2001.

HUPFER, C.; HOTZEL, H.; SACHSE, K.; ENGEL, K.-H. Detection of the genetic modification in heat-treated products from Bt maize by polymerase chain reaction. **Z. Lebensm. Unters. Forsch. A**, v.206, p. 203-206, 1998.

JAMES, C. Previw: Global Status of Commercialized Biotech GM Crops: 2004. **ISAAA Briefs**, Ithaca, NY, n. 32, 2004. Disponível em: < <http://www.isaaa.org> >. Acesso em: dez. 2005.

KLETER, G.A.; KUIPER, H.A. Considerations for the assessment of the safety of genetically modified animals used for human food or animal feed. **Livestock Production Science**, v.74, n.3, p. 275-285, 2002.

KUIPER, H. A. Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel food derived from genetically modified organisms. **Food Control**, v.10, p. 339-349, 1999.

LIPP, M.; BRODMANN, P.; PIETSCH, K.; PAUWELS, J.; ANKLAM, E.; BORCHERS, T.; BRAUNSCHWEIGER, G.; BUSCH, U.; EKLUND, E.; ERIKSEN, F. D.; FAGAN, J.; FELLINGER, A.; GAUGITSCH, H.; HAYES, D.; HERTEL, C.; HORTNER, H.; JOUDRIER, P.; KRUSE, L.; MEYER, R.; MIRAGLIA, M.; MULLER, W.; PHILLIPP, P.; POPPING, B.; RENTSCH, R.; WURTZ, A. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. **J AOAC Int**, v.82, n.4, p 923-8, 1999.

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

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. Tecnologia para produção de óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos. 1.ed. Londrina: Embrapa Soja, 2001.

MEYER, R.; CHARDONNENS, F.; HUBNER, P.; LUTHY, J. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. **Z Lebensm Unters Forsch.**, v.203, n.4, p. 339-44, 1996.

MIFFLIN, E. T. Control of contamination associated with PCR and other Amplification Reactions. **Molecular BioProducts, Inc.**, 1997.

MORRIS, S.; ADLEY, C. Evolving European GM regulation: an example of biopolitics at work. **Tibtech.**, v.18, p. 325-326, aug. 2000.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nuc. Acids Res.**, v.8, p. 4321-4325, 1980.

NAP, J. P.; METZ, P.; ESCALER, M; CONNER, A. J. The release of genetically modified crops into the environment. **The Plant Journal**, v.33, p. 1-18, 2003.

NEWCOMB, M. D. Corn and Animal Nutrition in the United States. **FDA**, BNF, U.S., 1995

OECD. Consensus document on compositional considerations for the new varieties of maize: key food and feed nutrients and anti-nutrients and secondary plant metabolites. **Series on the Safety of Novel Food and Feeds**, n.6, 2002.

OECD. Consensus document on compositional considerations for the new varieties of soybean: key food and feed nutrients and anti-nutrients. **Series on the Safety of Novel Food and Feeds**, n.2, 2001.

OLEXOVÁ, L.; DOVICOVICOVÁ, L.; KUTCHTA, T. Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, bisuits and instant paps. **Eur. Food Research and Technol.**, v.218, n.4, p.390-393, 2004.

ORTHOEFER, F. T. Processing and Utilization. In Soybean Physiology, Agronomy, and Utilization. **A. G. Norman, ed. Academic Press**, New York, p. 219-246, 1978.

ORTHOEFER, F. T.; SINRAM, R. D. Corn oil: composition, processing, and utilization.. In Corn Chemistry and Technology. Watson, S.A. and R.E. Ramstad, Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, p. 535-551, 1987.

PAULI. U.; LINIGER, M.; ZIMMERMANN, A. Detection of DNA in Soybean Oil. **Z Lebensm Untersforsch A** v.207. p 264 – 267, 1998.

PERRY, T. W. Corn as livestock feed. In Corn and Corn Improvement, 3rd ed. American Society of Agronomy, Inc. Wisconsin, p. 941-963, 1988.

POMS, R. E.; HOCHSTEINER, W.; LUGER, K.; GLÖSSL, J.; FOISSY, H. Model Studies on the Detectability of Genetically Modified Feeds in Milk. **Journal of Food Protection**, v.66, n. 2, p. 304–310, 2001.

PRINCE, A. M.; ANDRUS, L. PCR: how to kill unwanted DNA. **Biotechniques**,

Mar;12(3), p. 358-60, 1992.

RACKIS, J. J. Biological and physiological factors in soybeans. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.51, p. 161A-173A, 1974.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn. **Cold Spring Harbour Laboratory Press**, New York, 1989.

SMITH, K. J.; HUYSER, W. World distribution and significance of soybean. **American Society of Agronomy**, Madison, WI, Agronomy Monographs, n.16, p. 1–22, 1987.

STAVE, J. W. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations, and practical considerations. **Journal of AOAC International**, v.85, n.3, p. 780-786, 2002.

TRIFA, Y.; ZHANG, D. DNA content embryo and endosperm of maize kernel (*Zea Mays L.*): Impact on GMO quantification. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.1044-1048, 2004.

VAN DUIJN, G.; VAN BIERT, R.; BLEEKER-MARCELIS, H.; VAN BOEIJEN, I.; ADAN, A. J.; JHAKIE, S.; HESSING, M. Detection of Genetically Modified Organisms in Foods by PCR and DNA-based techniques: Bridging the Methods. **Journal of Int.**, v. 85, n.3, p. 787-791, 2002.

VOLLENHOFER, S.; BIRG, K.; SCHIMIDT, J.; KROATH, H. Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. **J. Agric. Food Chem.**, v.47, p. 5038-5043, 1999.

WAGNER, D. B.; FURNIER, G. R.; SAGMAI-MAROOF, M. A.; WILLIAMS, S. M.; DANKIK, B. P. Chloroplast polymorfism in lodgepole and Jack pines and their hybrids. **Proc Natl. Acad. Sci**, v. 84, p. 2097-2100, 1987.

WATSON, S. A. Corn marketing, processing and utilization. In Corn and Corn Improvement, 03 ed. **American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc.** Madison, WI., p, 881-940, 1988.

ANEXO 1

Descrição das 32 matrizes alimentares avaliados no presente estudo.

CAT	N	AMOSTRA	NOME COMERCIAL	INGREDIENTES
1	1	Soja em grãos	SOJA INTEGRAL	Feijão de soja
	2	Farelo de soja	SBM HIPRO	Farelo de soja
	3	Alimento torrado desengordurado ("torta")	SBM PELLETS	"torta"
	4	Lecitina de Soja	LECITINA DE SOJA	Lecitina de Soja
	5	Óleo de Soja Bruto Degomado	CRUDE DEGUMMED SOYABEAN OIL IN BULK	Óleo de soja bruto degomado
	6	Óleo de soja refinado, branqueado e desodorizado	REFINED BLEACHED AND DEODORIZED SOYBEAN OIL	Óleo de soja refinado, branqueado e desodorizado
	7	Proteína isolada de soja	DORESOY M – DOREMUS	Proteína isolada de soja
	8	Proteína Texturizada de soja	PROTEÍNA TEXT DE SOJA – COIMBRA	Proteína Texturizada de soja
2	9	Milho em Grãos	MILHO DE PIPOCA	Milho grupo duro, classe amarelo, tipo 2
	10	Amido de Milho	TURF	100% puro amido de milho
	11	Óleo de Milho Bruto	PURE CRUDE UNADULTERATED MAIZE GERM OIL IN BULK	Óleo de Milho Bruto
	12	Óleo de Milho Refinado	LIZA MILHO	Óleo de Milho Refinado
	13	Maltodextrina	MALTODEXTRINA	Maltodextrina
	14	Dextrose Monohidratada	CERELOSE®020020	Dextrose monohidratada
	15	Xarope de Alta frutose	INVERTOSE 026550	Xarope de frutose
	16	Xarope de glicose	EXCELL®1040	Xarope de glicose
	17	Farelo de Glúten	PROTENOSE®	Farelo de Glúten
3	18	Bolo Sabor artificial de Baunilha com Recheio de Cobertura Sabor Artificial de Chocolate (massa)	ANA MARIA CHOCOLATE	Açúcar, farinha de trigo fortificada com ferro e ácido fólico, ovo, gordura vegetal, açúcar invertido, farinha de soja, sal, fermento químico, pirofosfato ácido de sódio e bicarbonato de sódio, conservador propionato de cálcio, aromatizante.
	19	Bebida a base de Soja sabor original	PURITY SOJA LIGHT	Água, extrato de soja, sal, vitamina a e d, estabilizante goma carragena, edulcorante artificial, sucralose e aromatizante.
	20	Hambúrguer vegetal sabor frango, levemente temperado	GRAINS BURGER	Proteína texturizada de soja, Glúten de trigo, gordura vegetal hidrogenada, alho, cebola, sal, e condimentos naturais.
	21	Farinha de soja	FARINHA DE SOJA ORGÂNICA	Moagem de grãos soja tostados
	22	Farinha de Milho Flocada	KIMILHO FLOCÃO	Farinha de milho
	23	Amido de Milho	MAIZENA®	100% puro amido de milho
	24	Adoçante dietético em pó	TALQUAL FORNO E FOGÃO	Maltodextrina, edulcorantes artificiais ciclamato de sódio e sacarina sódica, regulador de acidez: citrato de sódio
	25	Cobertura Sabor Caramelo Colorida e Aromatizada Artificialmente	COBERTURA KARO CARAMELO	Glicose de milho, leite condensado, açúcar, sal, aromatizante, corante caramelo III, ácido cítrico, conservador sorbato de potássio, e corante artificiais tartrazina e ponceau RR.

4	26	Alimentado achocolatado em pó	NESCAU	Açúcar, cacau em pó, maltodextrina, minerais, vitaminas, emulsificante lecitina de soja e aromatizantes.
	27	Mistura para creme de milho	CREME DE MILHO	Farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico, farinha de milho, farinha de soja, amido, sal, gordura vegetal hydrogenada, maltodextrina, leite em pó desnatado, cebola, milho, pimenta do reino, noz moscada, salsa, realçador de sabor glutamato monossódico, aromatizante, estabilizante mono e diglicerídeo de ácido graxo e lecitina de soja.
	28	Barra com cobertura de chocolate sabor baunilha	EXCEED PROTEINBAR	Chocolate ao leite, concentrado protéico do soro do leite, xarope de frutose, xarope de glicose, proteína isolada de soja, gelatina hidrolisada, óleo de milho, crocante de biscoito, citrato de sódio, fosfato de sódio, fosfato de cálcio, umectante sorbitol, estabilizante lecitina de soja, aromatizante natural de baunilha, antioxidante DL alfa tocoferol e ácido ascórbico
	29	Sorvete sabor leite condensado com frutas vermelhas aromatizado artificialmente	MOÇA	Água, dextrose, polpas de morango, amora e framboesa, leite condensado, açúcar, leite em pó desnatado, gordura vegetal hydrogenada, xarope de glicose, soro de leite, caramelo, amido, sal, espessante goma jataí, goma guar, goma xantana, carboximetilcelulose sódica, carragena e pectina, estabilizantes mono e diglicerídeos de ácidos graxos e citrato de sódio, estabilizante lecitina de soja, aromatizantes, corantes naturais carmim cochonila e urucum, acidulante ácido cítrico e conservador sorbato de potássio
	30	Margarina	QUALY CREMOSA	Óleos vegetais líquidos e interesterificados, água, leite em pó desnatado reconstituído, soro de leite reconstituído, sal, estabilizante mono de diglicerídeos de ácidos graxos e lecitina de soja. Conservantes: sorbato e benzoato de sódio, acidulante ácido cítrico, antioxidante BHT, TBHQ e EDTA, corantes naturais de urucum e cúrcuma, e corante beta caroteno.
	31	Ração para Frango	RAÇÃO PARA AVES	Fubá de milho, glúten de milho, torta, farelo de amendoim, farelo de trigo, caulim, calcário calcítico, farinha de carne e ossos, sorgo integral moído, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral.
	32	Salsicha de frango	HOT DOG FRANGO	Carne mecanicamente separada de aves, carne de frango, água, proteína texturizada de soja (3%), amido, sal, maltodextrina, condimentos naturais, pimenta calabreza, regulador de acidez, lactato de sódio, estabilizante polifosfato de sódio, aromas naturais de pimenta branca e de fumaça, antioxidante eritorbato de sódio, realçador de sabor glutamato monossódio, conservador nitrito de sódio e corante urucum

ANEXO 2

Dados de Rendimento, Concentração e Pureza

	c	Parâmetro	Rendimento (ug/ 100mg de produto)		Concentração (ug/mL)		Pureza (A260/A280)	
Cat.	N	Matriz	CTAB média	silica média	CTAB média	silica média	CTAB média	silica média
C a t e g o r i a 1	1	Soja em grãos	1,5	3,2	44	16	1,6	1,8
	2	Farelo de soja	1,6	4,2	49	21	1,6	1,8
	3	Torta	4,8	0,0	145	0	1,8	0,0
	4	Lecitina de Soja	0,6	1,6	17	8	1,3	1,3
	5	Óleo de Soja Bruto Degomado	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	6	Óleo de soja refinado	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	7	Proteína isolada de soja	4,5	3,4	136	17	1,7	1,9
	8	Proteína concentrada de soja	3,3	3,2	98	16	1,8	1,9
C a t e g o r i a 2	9	Milho em Grãos	1,8	1,2	55	6	1,6	2,0
	10	Amido de Milho	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	11	Óleo de Milho Bruto	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	12	Óleo de Milho Refinado	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	13	Maltodextrina	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	14	Dextrose	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	15	Xarope de alta frutose	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	16	Xarope de glicose	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	17	Farelo de Glúten	2,0	0,0	59	0	1,8	0,0
C a t e g o r i a 3	18	Bolo Sabor artificial de Baunilha	1,1	0,0	34	0	1,5	0,0
	19	Bebida a base de Soja sabor original	1,0	0,0	30	0	1,7	0,0
	20	Hambúrguer vegetal sabor frango	1,3	1,5	38	8	1,7	1,6
	21	Farinha de soja	3,5	3,2	105	16	1,7	1,6
	22	Farinha de Milho Flocada	1,2	1,0	36	5	1,7	1,7
	23	Amido de Milho	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	24	Adoçante dietético em pó	0,0	2,4	0	12	0,0	1,4
	25	Cobertura Sabor Caramelo	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
C a t e g o r i a 4	26	Alimentado achocolatado em pó	0,0	1,6	0	8	0,0	1,3
	27	Barra com cobertura de chocolate	0,5	2,6	16	13	2,0	1,3
	28	Sorvete sabor leite condensado	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	29	Margarina	0,0	0,0	0	0	0,0	0,0
	30	Ração para Frango	2,0	1,2	60	6	1,7	1,4
	31	Salsicha de frango	5,7	1,3	172	7	1,7	1,5
	32	Mistura para Creme de Miho	1,6	1,3	46	7	1,9	2,0

ANEXO 3

Tabela. Ct médio obtido pela amplificação de DNA em tempo real do gene da lectina ou da invertase para as 20 matrizes alimentares que obtiveram amplificação do gene de referência pela PCR convencional.

Material testado	Ct médio do gene de referência		Δ Ct (Ct coluna de sílica - Ct CTAB)
	CTAB	Coluna de Sílica	
Soja em grãos	21,97	22,22	0,25
Farelo de soja	21,91	21,69	-0,22
Torta	21,70	21,05	-0,65
Lecitina de soja	26,30	26,50	0,20
Proteína isolada de soja	22,06	22,10	0,04
Proteína texturizada de soja	24,01	27,27	3,27
Milho em grãos	22,69	27,34	4,65
Amido	22,19	22,60	0,41
Farelo de glúten	24,11	indeterminado	indeterminado
Bolo Sabor artificial de baunilha	24,44	25,86	1,42
Bebida a base de soja sabor original	21,51	indeterminado	indeterminado
Hambúrguer vegetal sabor frango	25,49	38,88	13,39
Farinha de soja	22,27	20,09	-2,18
Farinha de milho flocada	21,60	indeterminado	indeterminado
Amido de milho comercial	22,26	23,31	1,06
Alimentado achocolatado em pó	36,19	indeterminado	indeterminado
Barra de proteína com cobertura de chocolate	26,91	29,22	2,31
Ração para frango ^a	30,96	indeterminado	indeterminado
Salsicha de frango ^a	30,16	42,30	12,15
Mistura para creme de miho ^b	(lectina) 28,08	26,91	-1,17
	(invertase) 21,01	25,10	4,09

a positivo somente gene da lecitina

b positivo para gene da lectina e invertase