

**FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO**

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS DE TRANSGÊNICOS EM  
ALIMENTOS NO BRASIL E DESENVOLVIMENTO DE  
METODOLOGIAS DE ANÁLISE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006**

**FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO**

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS DE TRANSGÊNICOS EM  
ALIMENTOS NO BRASIL E DESENVOLVIMENTO DE  
METODOLOGIAS DE ANÁLISE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**APROVADA: 07 de agosto de 2006.**

---

**Dra. Marta Fonseca M. Guimarães**  
(Co-orientadora)

---

**Prof. Wagner Campos Otoni**  
(Co-orientador)

---

**Profª Valéria Monteze Guimarães**

---

**Prof. Luiz Orlando de Oliveira**

---

**Prof. Everaldo Gonçalves de Barros**  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

***Agradecer é reconhecer a importância dos outros em nossas vidas...***

À Universidade Federal de Viçosa e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento por serem responsáveis por toda minha formação acadêmica. Em especial ao Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) por fornecer a estrutura e ambiente para realização de parte deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Genéticas pela possibilidade de concretizar meus experimentos e proporcionar o início de minha carreira profissional.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Trigo – Embrapa Trigo, pela minha liberação para conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Fátima e Manoel, pelo incentivo e compreensão nos momentos de ausência e por torcerem sempre pelo meu sucesso.

Aos meus irmãos pela amizade.

À minha tia Geralda, pelo carinho e preocupação.

Ao meu querido Sandro, pelo carinho, apoio, dedicação e cuidado constante.

Ao meu querido orientador, Professor Everaldo G. de Barros, pelo exemplo de profissionalismo e todos os ensinamentos no decorrer dos anos em que foi meu orientador. Obrigada pela confiança, liberdade de trabalho, apoio e por ter contribuído para o meu crescimento intelectual e profissional.

À Doutora Marta F. M. Guimarães, pela amizade, confiança, incentivo, sugestões, por sempre estar presente nas mais importantes decisões de minha vida e pela oportunidade de executar grande parte do meu trabalho no Laboratório de Análises Genéticas.

À querida Professora Elza Fernandes de Araújo e Lúcio Antônio de Oliveira Campos, pelo carinho, apoio, preocupação e ensinamentos.

Ao professor Wagner Campos Otoni, Valéria Monteze Guimarães e Luiz Orlando de Oliveira por terem aceitado participar em minha banca examinadora.

À Mariana e ao James pela ajuda e auxílio na condução dos experimentos, dedicação e amizade.

À Andréia Barcelos e Márcio Mendes pela torcida, amizade e pelas palavras de carinho e otimismo.

Aos amigos do Laboratório de Análises Genéticas: Wilton, Lílian, James e Sandra, pelos anos de convivência, companheirismo e união.

Aos meus queridos Irinéia e Walter Guimarães, por terem me acolhido em sua casa e por me darem total apoio no final desta jornada.

Às minha amigas Cida, Mirian, Wanessa e as Anas pelos momentos de descontração e torcida para meu sucesso.

Aos colegas do Laboratório de Sequenciamento, Biomol e Proteínas.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários Sidimar Sossai, Márcio Mendes e Professor Joaquin Patarroyo.

À Maurecilne, Daniela e Andréia pelo auxílio no Laboratório de Cultura de Tecidos.

Aos funcionários, Aloísio, Alessandra, Fausto, Gláucia, Luzia e Expedito, pela amizade, atenção e presteza.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO, filha de Manoel Ferreira Marcelino e Fátima de Lurdes Corrêa Marcelino, nasceu em 12 de fevereiro de 1977, em Carmo, Rio de Janeiro.

Em 1995, concluiu o Ensino Médio na Escola Estadual Professor Aurélio Duarte, em Carmo, RJ.

Em 1996, iniciou o curso superior na Universidade Federal de Viçosa, onde, em 12 de outubro de 2000, concluiu o curso de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas. Durante a graduação participou do Programa Especial de Treinamento – PET/BIOLOGIA (1998/2000), além de desenvolver atividades de Iniciação Científica nas linhas de pesquisa de Imunologia de Hematozoários (1997/98) e Genética Molecular de Plantas (1998/2000).

Em outubro de 2000, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa em 11 de novembro de 2002. No mesmo mês iniciou sua vida profissional atuando como Responsável Técnica do Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética, em Viçosa, MG, onde trabalhou durante três anos.

Em agosto de 2004 iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na UFV, submetendo-se a defesa em 07 de agosto de 2006.

Em dezembro de 2005 ingressou na Embrapa Trigo (Passo Fundo, RS), por meio de concurso público, no cargo de Técnica de Nível Superior III.

Em 2006 prestou concurso para o cargo de Pesquisador III para a Embrapa soja, sendo aprovada.

## CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIACÕES .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1. Organismos Geneticamente Modificados: Situação atual no Brasil e no Mundo .....	4
3.2. Organismos Geneticamente Modificados e a Legislação Nacional ..	5
3.3. Detecção e Quantificação de Alimentos Geneticamente Modificados .....	7
3.3.1. Metodologias para Extração de DNA em Alimentos .....	8
3.3.2. Detecção de Organismos Geneticamente Modificados em Alimentos pela Técnica de PCR .....	12
3.3.3. Quantificação de Organismos Geneticamente Modificados em Alimentos .....	13
3.3.3.1. <i>Ensaio Fluorogênico da Atividade 5' Exonucleásica (Metodologia TaqMan)</i> .....	15
3.3.3.2. <i>SYBR Green</i> .....	15
3.3.3.3. <i>Beacons Moleculares</i> .....	16
3.3.3.4. <i>Lux Primers</i> .....	16
3.3.4. Quantificação Absoluta X Quantificação Relativa .....	17
3.3.5. PCR Quantitativo em Tempo Real na Quantificação de Organismos Geneticamente Modificados em Alimentos .....	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	21

## **CAPÍTULO I**

### **Panorama Nacional da Presença de Resíduos Transgênicos em Alimentos no período 2000-2005**

RESUMO .....	25
1. INTRODUÇÃO .....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1. Material de Referência .....	29
2.2. Material para Análise .....	29
2.3. Extração de DNA .....	29
2.4. Oligonucleotídeos e Condições de Amplificação por PCR Qualitativo e Quantitativo .....	30
2.5. Avaliação da Demanda e Perfil das Amostras Analisadas para a Presença de Resíduos Transgênicos .....	31
2.6. Avaliação das Amostras quanto à Presença de Resíduos Transgênicos .....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4. CONCLUSÕES .....	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

## **CAPÍTULO 2**

### **Detection and quantification of Roundup Ready® soybean residues in sausage samples by conventional and Real-Time PCR**

ABSTRACT .....	60
1. INTRODUCTION .....	62
2. MATERIALS AND METHODS .....	64
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	67
4. CONCLUSIONS .....	77
5. ACKNOWLEDGMENT .....	77
6. REFERENCES .....	78

### **CAPÍTULO 3**

#### **Construção de padrões de calibração baseados em número de cópias de plasmídios recombinantes para a quantificação de OGMs em alimentos pela técnica de PCR quantitativo**

RESUMO.....	81
1. INTRODUÇÃO .....	83
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	87
2.1. Material de Referência .....	87
2.2. Extração de DNA Genômico .....	87
2.3. Oligonucleotídeos e Condições de Amplificação por PCR Qualitativo e Quantitativo .....	88
2.4. Obtenção dos Fragmentos .....	89
2.5. Clonagem dos Fragmentos .....	89
2.6. Extração do DNA Plasmidial .....	91
2.7. Quantificação do DNA Plasmidial .....	91
2.8. Construção das Curvas de Calibração Baseadas em p-DNA para a Quantificação de OGMs .....	91
2.9. Determinação da Acuracidade e Precisão da Quantificação de OGMs Utilizando Curvas de Calibração Baseadas em p-DNA .....	93
2.10. Determinação do Conteúdo de Soja GM em Amostras de Alimentos utilizando Curvas de Calibração Baseadas em p-DNA .....	94
3. RESULTADOS .....	95
4. DISCUSSÃO .....	124
5. CONCLUSÕES .....	128
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	129

## LISTA DE ABREVIações

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ct	Cycle threshold
CRM	material de referência certificado
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CV (%)	Coeficiente de variação
Ct	Ct do alvo menos o Ct da referência endógena
EPSPS	enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
gDNA	DNA genômico
GM	Geneticamente modificados
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OD	Densidade ótica
OGMs	Organismos geneticamente modificados
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
pDNA	DNA plasmidial
RR	Roundup Ready
R (%)	Taxa de recuperação
R <sup>2</sup>	Coeficiente de Correlação
SD	Desvio padrão
SDS	Duodecil sulfato de sódio

## RESUMO

MARCELINO, Francismar Corrêa, D. S. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2006. **Avaliação de resíduos de transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-Orientadores: Marta Fonseca M. Guimarães e Wagner Campos Otoni.

Desde a liberação da primeira variedade transgênica para consumo humano, o tomate “*Flavr savr*”, em 1995, o aumento no plantio e comercialização de organismos geneticamente modificados (OGMs) já aumentou mais de 50 vezes, atingindo em 2005 a cifra de 90 milhões de hectares plantados com algum tipo de OGM em 21 países. Estima-se que em 2006 esta cifra supere 100 milhões de hectares. No Brasil, a liberação do plantio e comércio de OGMs ocorreu apenas em 2003, com a soja Roundup Ready® (RR). O aumento do cultivo e comércio de OGMs é refletido no aumento da presença destes na composição dos alimentos. Neste trabalho é apresentado o panorama nacional da presença de OGMs em diferentes produtos analisados pela Empresa AgroGenética, no período de 2000 a 2005. Foram analisados diferentes tipos de alimentos que apresentam, principalmente, soja e/ou milho em sua composição, bem como grãos e produtos *in natura*, oriundos de diversas regiões do país. De acordo com os resultados, resíduos de OGMs estão presentes nos alimentos comercializados no país desde o primeiro ano em que estes começaram a ser analisados pela empresa; a cada ano, o número de amostras contendo resíduos transgênicos foi se elevando com relação ao total de amostras analisadas, sendo principalmente detectados em alimentos que apresentam alto conteúdo de soja em sua composição, como amostras de salsichas e empanados. Tal situação tem levado à necessidade do desenvolvimento de metodologias que permitam a detecção, quantificação e identificação destes resíduos. Uma das principais dificuldades da análise de resíduos transgênicos em alimentos é a necessidade de extrair DNA em quantidade e com qualidade satisfatória para a análise. Deste modo, o presente trabalho também apresenta o processo de validação da extração de DNA para a

análise da presença e quantificação de resíduos transgênicos em amostras de salsichas, a classe de produto analisada que apresentou o maior número de amostras positivas para a presença de resíduos transgênicos (70,73%). Além da obtenção de DNA de boa qualidade, outra etapa crítica para a quantificação de OGMs, pela técnica de PCR quantitativo é a construção da curva de calibração a ser empregada para a análise. O percentual da presença de OGMs em uma amostra é dada em termos absolutos, de modo que uma curva de calibração deve ser construída com padrões que apresentem percentuais de OGMs cuidadosamente definidos. Os padrões de referência são essenciais para a determinação do percentual de OGM presente nas amostras, e são específicos para cada tipo de evento e organismo. Atualmente, não se encontram disponíveis no mercado internacional padrões de referência certificados para todos os eventos e variedades transgênicas, e os únicos padrões comercializados são padrões de calibração que variam apenas de 0,1 a 5% em peso de farinha do grão geneticamente modificado (GM) com relação ao peso de farinha do grão normal da espécie em questão. Na etapa final deste trabalho é descrito o desenvolvimento de padrões de calibração baseados em DNA plasmidial. A curva construída com base em DNA plasmidial permitiu a quantificação precisa do percentual de resíduos transgênicos nas amostras quando comparada com a quantificação utilizando DNA genômico obtido de padrões de referência certificados.

## ABSTRACT

MARCELINO, Francismar Corrêa, D. S. Universidade Federal de Viçosa, August 2006. **Evaluation of transgenic residues in foods in Brazil and development of analytical methodologies.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-Advisers: Marta Fonseca M. Guimarães and Wagner Campos Otoni.

Since the liberation of the first transgenic variety for human consumption, the tomato “*Flavr savr*”, in 1995, the plantation and commercialization of genetically modified organisms (GMOs) has increased over 50 times, reaching 90 million hectares planted with some kind of GMO in 21 countries, in 2005. It is estimated that in 2006 this value will surpass 100 million hectares. In Brazil, the liberation of plantation and commercialization of GMOs only occurred in 2003, with the soybean Roundup Ready® (RR). The increase on planting and commercialization of GMOs is reflected on the increase of their presence in the composition of foods. In the present work, the national panorama of the presence of GMOs in different products, analyzed by the company AgroGenética, between the years 2000 and 2005, is shown. Different types of food were analyzed which presented, mainly, soybean and/or maize in their composition, as well as grains and products *in natura*, derived from different regions of the country. According to the results, GMO residues are present in foods commercialized in the country since the first year of their analysis by the company; each year, the number of samples containing transgenic residues has increased, being mainly detected in foods with high soybean content in their composition, such as sausages and breaded foods. This situation has led to the necessity of developing methodologies that allow the detection, quantification and identification of these residues. One of the main difficulties in the analysis of transgenic residues in food is the need of extracting satisfactory amounts of DNA and with good quality for analysis. This work also presents the process of validation of DNA extraction procedures for analysis of presence and quantification of transgenic residues in sausages, the product class that presented the greatest number of positive

samples for the presence of transgenic residues (70.73%). In addition to the availability of good quality DNA, another critical stage for the GMO quantification by the quantitative PCR technique is the establishment of a calibration curve to be employed in the analysis. The presence of GMOs in a sample is given in absolute terms, so that a calibration curve must be established with standards that present carefully defined GMO concentration. The reference standards are essential for the determination of the percentage of GMOs present in the samples, and are specific for each type of event and organism. Currently, certified reference standards are not available in the international market for all events and transgenic varieties, and the only commercialized ones are calibration standards that vary only from 0.1 to 5% in flour weight of the genetically modified grain in relation to the flour weight of the normal grain of the species in question. At the final stage of this work, the development of calibration standards based on plasmid DNA is described. The established curve based on plasmid DNA allowed the precise quantification of the percentage of transgenic residues in the samples, when compared to the quantification using genomic DNA obtained from certified reference standards.

## 1. INTRODUÇÃO

Com o aumento do plantio e comércio de organismos geneticamente modificados (OGMs), alimentos contendo resíduos destes passaram a ser consumidos em larga escala em muitos países, muitas vezes sem o conhecimento do consumidor. Desta forma, questões referentes ao direito à informação da origem transgênica dos produtos tornam-se relevantes. No Brasil, a rotulagem é obrigatória para produtos embalados, a granel ou *in natura*, que contenham ou que sejam produzidos com OGMs, a partir do limite de 1,0% do produto final, conforme determina o decreto Nº 4.680 de 25 de abril de 2003. Deste modo, a necessidade de monitorar a presença e determinar o percentual de resíduos transgênicos em diversos alimentos, tem gerado a demanda pelo desenvolvimento de metodologias capazes de detectar, identificar e quantificar DNA exógeno ou proteínas características dos OGMs. Tais metodologias necessitam ser desenvolvidas, aprimoradas e, principalmente, validadas, para que os resultados obtidos sejam confiáveis, robustos e precisos.

Dentre as metodologias de detecção de resíduos transgênicos em alimentos destacam-se aquelas que se baseiam na detecção de moléculas de DNA ou da proteína expressa. Metodologias baseadas na presença da proteína expressa são apenas empregadas para a análise de grãos ou produtos *in natura*. Para a análise de alimentos processados, técnicas que permitem a detecção de moléculas de DNA alvo são utilizadas. Dentre estas, a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é a metodologia mais aceita internacionalmente. A técnica de PCR, além de apresentar um custo relativamente baixo, possui alta sensibilidade e o DNA alvo para a análise pode ainda apresentar certo nível de degradação, comum em amostras de alimentos.

Apesar de ser bastante sensível, em uma primeira etapa a técnica só permite detectar e/ou identificar a presença do transgene. Para a detecção são utilizados *primers* específicos para alvos comuns nos cassetes de transformação, entre estes se destacam o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e o terminador NOS de *Agrobacterium* sp. A utilização de *primers* específicos para estas regiões permite um *screening* inicial da presença de resíduos transgênicos na amostra, no entanto, nessa primeira etapa não é possível discriminar a presença de resíduos

transgênicos provenientes de eventos específicos, até mesmo provenientes de diferentes matrizes, como a soja e o milho.

Para a identificação do evento transgênico é necessário que a amplificação do DNA seja realizada com *primers* específicos para a região codificadora, sendo que o emprego de *primers* que pareiam nas junções entre a região promotora ou da seqüência líder com a região codificadora, garantem maior especificidade. Análises de identificação de eventos transgênicos são importantes principalmente em alimentos compostos de diferentes matrizes. São também importantes em locais em que haja alguns eventos transgênicos liberados enquanto outros não, como ocorre no Brasil. No entanto, uma vez que o teste inicial tenha sido positivo, a determinação do percentual do resíduo GM presente no produto só é possível por uma análise de quantificação do DNA alvo.

A quantificação de moléculas de DNA GM presentes em alimentos pode ser realizada por diferentes metodologias, no entanto, a técnica de PCR quantitativo vem sendo a mais utilizada. Embora seja uma técnica de custo elevado, a PCR quantitativo é altamente precisa, com altos níveis de repetibilidade e reprodutibilidade, garantindo sua grande eficiência em análises de fiscalização, em cumprimento à legislação nacional e internacional específicas.

Atualmente, no Brasil não existem estudos de validação de metodologias para a detecção e quantificação de resíduos transgênicos em alimentos e poucos são os laboratórios privados e públicos que têm trabalhado neste sentido. Apenas um estudo de proficiência, sob coordenação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), realizado no ano de 2002, analisou o desempenho de laboratórios nacionais quanto à repetibilidade e reprodutibilidade da detecção de OGM em farinha de soja. Devido à tendência de que novos produtos oriundos da biotecnologia cheguem cada vez mais ao consumidor, é imprescindível que haja metodologias validadas para a detecção, identificação e quantificação de OGMs para os mais diferentes tipos de alimentos, desde grãos, produtos *in natura* e processados.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral estabelecer metodologias para a detecção e quantificação de resíduos transgênicos em alimentos e traçar o panorama nacional da presença destes resíduos em alimentos comercializados no país.

Os objetivos específicos foram:

1) Fornecer uma visão sobre a presença de resíduos OGMs em diferentes produtos alimentícios comercializados no mercado nacional, desde grãos, produtos *in natura* e processados, com base na análise amostral de produtos de diferentes origens recebidas pelo Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética, empresa graduada pelo Sistema de Incubadora de Empresas de Base Tecnológica da Universidade Federal de Viçosa, durante o período de 2000 a 2005.

2) Validação de uma metodologia para detecção e quantificação de resíduos transgênicos em amostras de produtos processados (salsichas), utilizando as técnicas de PCR Convencional e em Tempo Real.

3) Construção de padrões de calibração baseados no número de cópias de plasmídios recombinantes para a quantificação de OGMs em alimentos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Organismos Geneticamente Modificados: Situação Atual no Brasil e no Mundo

A biotecnologia tem possibilitado a obtenção de respostas rápidas e seguras na resolução de questões importantes, como a susceptibilidade de plantas e animais a pragas, doenças e estresses ambientais. Possibilita, também, o desenvolvimento de espécies mais produtivas e com maior valor nutricional. Um dos principais frutos da biotecnologia é o desenvolvimento dos OGMs, que passaram a oferecer alternativas importantes para vários problemas de caráter econômico e relacionados à melhoria na qualidade de vida humana e do ambiente.

A primeira variedade vegetal GM a atingir o mercado consumidor foi o tomate “*Flavr savr*”, em 1995. Nesta variedade o gene que codifica a proteína poligalacturonase, responsável pela hidrólise de componentes da parede celular, foi inativado pela técnica de RNA anti-senso, levando ao amadurecimento tardio do fruto (KRAMMER *et al.*, 1994). Posteriormente, novas variedades de outras espécies, como a soja, milho, canola e algodão foram desenvolvidas (DUIJN *et al.*, 1999).

Segundo os dados da *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* (ISAAA) (JAMES, 2006), durante o período de dez anos, entre 1996 e 2005, a área total cultivada com lavouras transgênicas cresceu mais de 50 vezes, passando de 1,7 milhão de hectares em 1996 para 90,0 milhões de hectares em 2005, com a crescente participação dos países em desenvolvimento. De 2004 para 2005 houve aumento de 9 milhões de hectares, o que equivale a uma taxa anual de crescimento de 11%.

Em 2005, 21 países plantaram cultivos GM, comparativamente aos 17 países em 2004. Três destes foram países pertencentes à União Européia, Portugal, França e a República Tcheca, enquanto o quarto foi o Irã. Dos 21 países que plantaram cultivo GM, estavam incluídos 11 países em desenvolvimento e 10 países industrializados. Em ordem decrescente por número de hectares plantados com cultivos GM estão: Estados Unidos, Argentina, Brasil, Canadá, China, Paraguai, Índia, África do Sul, Uruguai, Austrália, México, Romênia, Filipinas, Espanha, Colômbia, Irã, Honduras, Portugal, Alemanha, França e a República Tcheca.

O país que mais aumentou o cultivo de plantas GM em 2005 foi o Brasil, com um aumento de área estimado em 4,4 milhões de ha (9,4 milhões de ha em 2005 comparados aos 5 milhões em 2004), seguido pelos Estados Unidos (2,2 milhões de ha), Argentina (0,9 milhões de ha) e Índia (0,8 milhões de ha). A Índia apresentou o maior aumento proporcional anual, quase triplicando sua área de 500.000 ha em 2004 para 1,3 milhões de ha em 2005.

As principais espécies de transgênicos plantadas foram: a soja resistente ao herbicida glifosato, o milho e o algodão resistentes a inseto e a canola resistente a herbicida. Em 2005, a soja GM ocupou 54,4 milhões de ha comparados com os 48,4 milhões de ha registrados em 2004; o milho GM foi plantado em 21,2 milhões de ha em comparação com os 19,3 milhões de ha de 2004; o algodão transgênico foi cultivado em 9,8 milhões de ha, acima dos 9,0 milhões de ha plantados em 2004; e a canola GM ocupou 4,6 milhões de ha, enquanto, em 2004, ficou na casa dos 4,3 milhões de ha.

Em 2005, a soja GM continuou a ser o principal cultivo desenvolvido pela biotecnologia, ocupando 54,4 milhões de ha (60% da área mundial de cultivos GM), seguida pelo milho (21,2 milhões de ha, 24% da área total), algodão (9,8 milhões de ha, 11% da área total) e canola (4,6 milhões de ha, 5% da área total).

No Brasil, o plantio e comércio da soja Roundup Ready<sup>®</sup> foram aprovados por três anos consecutivos, 2003, 2004 e 2005 pelas leis Nº 10.688, 10.814 e 11.092, respectivamente. Em 2003, 3 milhões de hectares foram plantados com soja GM; em 2004 este número atingiu 5 milhões de hectares, e, em 2005, o aumento foi altamente expressivo, atingindo 9,4 milhões de hectares (JAMES, 2006). Este aumento pode ser explicado pela publicação da nova Lei de Biossegurança (Lei Nº 11.105) em março de 2005, que regulamentou a liberação do plantio e comércio da soja RR no país.

### **3.2. Organismos Geneticamente Modificados e a Legislação Nacional**

No Brasil, a partir de janeiro de 1995, a Lei de Biossegurança (Nº 8.974), regulamentada por meio do Decreto Nº 1.752, passou a estabelecer e impor condições de segurança e regulamentar as atividades de biotecnologia, estabelecendo a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), suas atribuições e competências. Recentemente, foi aprovada pela Câmara uma nova Lei

de Biossegurança (Nº 11.105/2005), que revoga a anterior e estabelece novas normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam OGMs e seus derivados, reestrutura a CTNBio e cria o Conselho Nacional de Biossegurança.

No Brasil, a primeira liberação legal de um OGM foi em 2003, por intermédio a Lei Nº 10.688, de 13 de junho de 2003, quando a soja RR foi liberada para comercialização como grão até 31 de janeiro de 2004. Nos anos posteriores, novas liberações para plantio e comercialização de soja GM foram realizadas, em 2004 (Lei Nº 10.814) e em 2005 (Lei Nº 11.092). Nestes dois últimos anos, os agricultores que vinham plantando soja GM firmaram um Termo de Compromisso, Responsabilidade e Ajustamento de conduta, junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mediante o Decreto Nº 4.846, que define área, localidade do plantio e responsabilidades do agricultor advindas do uso da Biotecnologia.

À medida que se intensificou o plantio de soja GM no país, a sua presença em alimentos e produtos finais destinados ao consumo humano ou animal também se intensificou. A soja participa da composição de grande parte dos produtos comercializados no mercado nacional, e sua adição ocorre na forma natural do grão ou como proteína, gordura, óleo, extrato ou lecitina. Sendo assim, alimentos contendo OGM passaram a ser consumidos em larga escala, tanto no Brasil como em outros países, muitas vezes de forma ilegal ou sem o conhecimento do consumidor. Desta forma, tornou-se necessário a normatização de questões referentes ao direito à informação, assegurado pelo Código de Defesa do Consumidor (Lei Nº 8.078 de 11 de setembro de 1990). Segundo esta Lei, no artigo 31, a oferta e apresentação de produtos devem assegurar informações corretas, claras, precisas, em língua portuguesa, e ainda informar sobre suas qualidades, quantidade, composição, preço, garantia, prazos de validade e origem, bem como os riscos que apresentam à saúde e segurança dos consumidores. Ainda, qualquer alimento que seja comercializado, independente de sua origem, e que seja embalado na ausência do consumidor, deve obedecer aos regulamentos técnicos para rotulagem de alimentos em geral, publicados na Resolução RDC Nº 259-ANVISA/MS/2002. No caso dos OGMs, ainda se aplica, de maneira complementar, uma regulamentação específica para rotulagem de alimentos GM.

Em vários países, assim como no Brasil, a legislação para a rotulagem de GM estabelece limites específicos para a presença do OGM na composição do alimento. Quando a alimento apresentar valores percentuais da presença do OGM acima do limite estabelecido, esta informação deve constar no rótulo.

A rotulagem é uma importante ferramenta de proteção ao consumidor, principalmente por oferecer condições de rastreabilidade até o produto final. No Brasil, a rotulagem é obrigatória para produtos embalados, a granel ou *in natura*, que contenham ou que sejam produzidos a partir de OGM, a partir do limite de 1,0% do produto final, conforme determina o Decreto Nº 4.680 de 25 de abril 2003, que revogou o anterior (Decreto Nº 3.871 de 18 de julho de 2001), que estabelecia o limite de 4,0% e somente para produtos embalados. O decreto estabelece ainda que no rótulo deva constar, juntamente com as expressões, “pode conter soja transgênica” e “pode conter ingrediente produzido a partir de soja transgênica”, o símbolo “T” , definido pela Portaria Nº 2.658 de 22 de dezembro de 2003, pelo Ministério da Justiça.

Outra imposição do decreto é que alimentos e ingredientes produzidos a partir de animais alimentados com ração contendo ingredientes transgênicos deverão trazer no painel um dos seguintes avisos: “nome do animal” alimentado com ração contendo ingrediente transgênico “nome do ingrediente” ou produzido a partir de animal alimentado com ração contendo ingrediente transgênico.

A obrigatoriedade destas informações nos rótulos indica claramente a necessidade de metodologias confiáveis de detecção e quantificação em alimentos. Deste modo, metodologias vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas para garantir o cumprimento da legislação e padronização dos resultados.

### **3.3. Detecção e Quantificação de Alimentos Geneticamente Modificados**

A detecção de um organismo com uma determinada alteração em seu material genético pode ser realizada a partir das diferentes moléculas envolvidas na expressão gênica: a molécula de DNA contendo a alteração genética propriamente dita, o mRNA ou proteína expressos e, ainda, com base na alteração fenotípica decorrente da modificação inserida. As alterações no fenótipo não são facilmente observáveis em muitos casos, uma vez que se manifestam somente na presença de

uma determinada condição ambiental, como no caso da soja resistente ao glifosato e do milho resistente a inseto.

A detecção de OGMs com base no mRNA é inviabilizada, principalmente devido à grande instabilidade desse tipo de molécula. De modo semelhante à detecção baseada em mRNA, a detecção de proteínas está na dependência da especificidade temporal e tecidual da expressão do transgene. Além destas limitações, ambas as moléculas apresentam restrições ao serem manuseadas, e no caso de proteínas, a manutenção de sua estabilidade é crucial para ser possível a sua detecção. Deste modo, os principais métodos de detecção de OGMs se baseiam na análise do DNA, que está presente em todas as células do organismo e apresenta uma razoável estabilidade *in vitro*.

No caso específico de detecção e quantificação de resíduos de OGMs em alimentos, métodos baseados na presença do DNA ou da proteína exógena vêm sendo utilizados. Os métodos baseados na detecção ou quantificação da proteína alvo exploram a capacidade de interação altamente específica entre antígeno e anticorpo. Dentre os métodos disponíveis destacam-se o teste da tira de fluxo lateral e o ELISA. Estes são utilizados principalmente para produtos *in natura*, devido à necessidade da manutenção de estrutura da proteína.

Os métodos baseados no DNA utilizam a técnica da PCR para a detecção e quantificação de resíduos transgênicos, tanto em produtos *in natura* como produtos processados. Devido sua alta eficiência, repetibilidade e sensibilidade, a técnica de PCR vem sendo a principal metodologia empregada para a detecção de resíduos transgênicos em alimentos. Neste estudo será abordado a metodologia de detecção e quantificação de resíduos transgênicos em alimentos utilizando a técnica de PCR convencional e quantitativo em tempo real.

### **3.3.1. Metodologias para Extração de DNA em Alimentos**

Os mais importantes pré-requisitos para a aplicação de métodos de detecção e quantificação de OGMs em alimentos, utilizando a metodologia de PCR, são o conhecimento da construção genética exógena a ser detectada e a habilidade em extrair quantidades suficientes de DNA amplificável da amostra a ser investigada. Cumpridos esses dois pré-requisitos, a detecção e quantificação baseada em PCR podem ser rapidamente estabelecidas para qualquer OGM (WURZ *et al.*, 1999).

Como as Leis de Rotulagem em vigor no Brasil se aplicam à quantidade de transgênico presente no produto final, e não na matéria-prima adicionada ao produto, metodologias de extração de DNA para os mais variados tipos de produtos e matrizes, como biscoitos, produtos cárneos, temperos, bebidas lácteas, sucos, entre outros, necessitam ser desenvolvidas e validadas. Considerando-se apenas a soja e o milho, as duas principais culturas GM cultivadas no mundo, grande parte dos produtos alimentícios industrializados apresenta em sua composição uma destas matérias prima, que são adicionadas como extrato, proteína, gordura vegetal, lecitina, amido ou óleo.

Produtos finais altamente processados, devido aos mais variados métodos de tratamentos que sofrem ao longo da cadeia produtiva, bem como a adição dos mais diferentes tipos de ingredientes, apresentam maiores dificuldades para serem analisados. Alguns ingredientes como proteínas, polissacarídeos, gorduras, sal, dentre outros, presentes na composição do alimento, podem atuar como inibidores da PCR. Tratamentos químicos ou físicos, atividades enzimáticas ou extremos de pH podem levar à fragmentação do DNA de maneira a torná-lo inviável para a análise.

Estes efeitos implicam que a sensibilidade da detecção e quantificação de transgênicos, estabelecida durante a validação do método, deve ser específica para a matriz utilizada durante a validação, não podendo ser extrapolada para outras matrizes. Decréscimo na quantidade de DNA extraída da matriz alvo ou o comprometimento da integridade das moléculas de DNA levam a uma elevação nos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), expressos em termos da quantidade de DNA GM em relação ao DNA total da matriz alvo. Em casos extremos, onde a eficiência de extração de DNA é extremamente baixa, como no caso de amostras de óleos refinados e amido, a reprodutibilidade do método é baixa e os valores de LOD e LOQ desconhecidos, sendo freqüentes resultados falsos negativos (LIPP *et al.*, 2005).

Outro fator a considerar é a quantidade da matriz que pode conter OGM adicionado ao produto. Esta matriz pode representar apenas uma pequena fração do produto final. Em amostras de salsicha, por exemplo, apenas 2,0% a 7,5% da composição é originada de proteína de soja, a maior parte é de origem animal. Quanto menor for a quantidade do ingrediente alvo, da qual se pretender extrair

DNA ou proteína para análise, em relação aos outros ingredientes presentes no produto, mais difícil será a detecção de resíduos transgênicos. A maneira como a matriz GM se apresenta dispersa entre as diferentes matrizes que compõem o produto final, se de modo aleatório ou não, deve ser também levada em consideração, para se evitar problemas de homogeneização e amostragem (ANLKLAM *et al.*, 2002; REMUND *et al.*, 2001).

Sendo assim, cada produto a ser analisado deve ser previamente avaliado com relação ao seu nível de processamento, composição, distribuição das diferentes matrizes e capacidade de se extrair DNA em quantidade e com qualidade para ser amplificado pela técnica de PCR. A extração do DNA constitui uma das etapas mais importantes no processo de validação do método.

A extração de DNA compreende três principais etapas: (1) a lise da célula, (2) inativação de nucleases celulares e (3) separação do DNA dos outros componentes celulares por precipitação ou filtração. A lise deve ser rigorosa o suficiente para romper as membranas celulares liberando o material genético e, ao mesmo tempo, gentil o suficiente para preservar o ácido nucléico. A lise pode ser feita de modo mecânico, por tratamento químico com agentes caotrópicos, detergentes e ainda por digestão enzimática. A lise e a inativação das nucleases celulares podem ser combinadas em uma única etapa, pelo emprego de uma solução que contenha um detergente para solubilizar os componentes da membrana celular e um sal para inativar enzimas intracelulares.

Para a separação do ácido nucléico do extrato celular podem ser combinadas duas ou mais metodologias, como: (1) extração e precipitação, por exemplo, a combinação de fenol e clorofórmio para remoção de proteínas, seguida da precipitação com isopropanol ou etanol, ou utilizando altas concentrações de sal ou mudanças no pH; (2) cromatografia que pode utilizar diferentes técnicas de separação como filtração de gel, troca iônica ou adsorção seletiva. Na cromatografia por filtração em gel a molécula alvo é recuperada em função de seu tamanho molecular, de acordo com o tamanho dos poros do gel. Na cromatografia de troca iônica são utilizadas interações eletrostáticas entre a molécula alvo e grupos funcionais da matriz. No caso dos ácidos nucléicos, negativamente carregados, podem ser eluídos com um tampão salino ou água. No processo de adsorção, o ácido nucléico é adsorvido seletivamente em sílica ou vidro em presença de

determinados sais caotrópicos. Uma solução salina de baixa concentração ou água são capazes de eluir o DNA; (3) centrifugação em gradiente de CsCl ou combinada com uma coluna cromatográfica de adsorção ao qual o DNA fica adsorvido por afinidade. Após a centrifugação o DNA é recuperado livre de contaminantes menos conspícuos, como sais e nucleotídeos (ZIMMERMANN *et al.*, 2000). Embora permita a purificação de DNA de alta qualidade, a centrifugação em gradiente de CsCl é uma estratégia muito trabalhosa o que a torna pouco comum.

Um método de extração que vem sendo largamente utilizado para a extração de DNA para análise de OGM de matérias primas vegetais (LIPP *et al.*, 1999) e para alguns produtos processados, como tofu e farinha de soja (ZIMMERMANN *et al.*, 1998), é o que utiliza brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Tal método foi descrito primeiramente por MURRAY e THOMPSON (1980), mas várias adaptações também já foram descritas (HUPFER *et al.*, 1998; HOTZEL *et al.*, 1999; MEYER *et al.*, 1996; MEYER *et al.*, 1997). Esse método é eficiente, particularmente para eliminação de polissacarídeos e compostos fenólicos que afetam severamente a pureza do DNA.

Outro método também validado para extração de produtos processados para detecção de OGM é o Wizard, comercializado na forma de um *kit* pela Promega. O método utiliza uma resina que tem afinidade de ligação ao DNA, de modo que este é diretamente purificado da solução após digestão enzimática com proteinase K e tratamento químico com SDS (duodecil sulfato de sódio).

Para alguns alimentos processados, tratamentos prévios à extração são recomendados para garantir melhor eficiência e pureza no DNA isolado. Amostras ácidas, como sucos de frutas e molho de tomate, podem ser neutralizadas por meio de um pré-tratamento com hidróxido de sódio (BOURKE *et al.*, 1999). Amostras ricas em gorduras, como óleos brutos e lecitinas, que não se dispersam na fase aquosa do tampão de lise, devem ser previamente tratadas com um composto orgânico, como por exemplo, o hexano (SOLFRIZZO *et al.*, 1998). Ainda, amostras ricas em polissacarídeos, um forte inibidor da reação de PCR, como as de amido de milho, devem ser previamente tratadas com uma enzima glicosilase (CARRE *et al.*, 1988).

Alguns reagentes químicos, como fenol, SDS, CTAB, utilizados na própria extração do DNA, atuam como fortes inibidores da reação de PCR, de modo que devem ser eliminados no final do processo, durante a precipitação do DNA e lavagem com etanol.

Embora grande esforço seja empregado para a obtenção de DNA de boa qualidade a partir de produtos processados, é esperado que o DNA obtido apresente forte degradação. Mesmo assim, de um modo geral, ele é passível de ser analisado, uma vez que os produtos alvos de amplificação esperados apresentam, em média, 200 pb. Para aumentar a eficiência da precipitação do DNA, por exemplo, em amostra com pouca quantidade de DNA ou altamente degradada, com fragmentos inferiores a 200 pb, onde a precipitação com etanol é ineficiente (WINFREY *et al.*, 1997), é recomendado o uso de  $MgCl_2$  10 mM ou glicogênio a 10  $\mu g/mL$ .

### **3.3.2. Detecção de Organismos Geneticamente Modificados em Alimentos pela Técnica de PCR**

Alguns métodos analíticos que utilizam a PCR têm sido desenvolvidos para detectar qualitativamente a presença de seqüências modificadas de ácidos nucleicos em alimentos transgênicos (EHLERS *et al.*, 1997; KOPPEL *et al.*, 1997). A análise qualitativa baseia-se na amplificação de um fragmento de DNA específico do transgene: da região promotora, da região terminadora, do gene marcador ou algum segmento de DNA exógeno a ele associado. A amplificação é feita pela enzima DNA polimerase, que utiliza pequenas sequências iniciadores específicas de DNA, denominadas *primers*, que flanqueiam a região que se deseja amplificar. Além da molécula alvo, dos iniciadores e da enzima DNA polimerase, também é necessária a adição dos desoxinucleosídeos trifosfatados e de  $Mg^{+2}$ , que atua como cofator da polimerase. Em princípio, em uma PCR o número de seqüências alvo amplificadas aumenta exponencialmente a cada ciclo, que é constituído de três diferentes etapas. Na primeira etapa, a molécula de DNA alvo é desnaturada a uma temperatura em torno de 94°C, seguida de uma redução em torno de 50 a 60°C, para o anelamento dos *primers*. Finalmente, a temperatura é elevada a 72°C, para que haja a polimerização pela DNA polimerase. Os ciclos são repetidos 20 até 45 vezes, dependendo da quantidade de DNA alvo ou do tamanho do fragmento a ser amplificado. Após cada ciclo, as moléculas obtidas são utilizadas como molde para um novo ciclo de amplificação, obtendo-se amplificação exponencial do número de fragmentos. Isto resulta na obtenção de até um bilhão de cópias da seqüência alvo após x ciclos.

Rotineiramente são realizados *screening* para detecção de alimentos GM com *primers* que flanqueiam na região promotora 35S do vírus do mosaico da couve flor e da região terminadora NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, ambos presentes na maioria dos transgênicos atualmente comercializados. No entanto, para a identificação do evento transgênico, são necessários *primers* específicos que flanqueiem a região codificadora ou alguma região que seja específica do transgene, ou ainda os sítios de inserção e regiões terminais do cassete de clonagem.

As características mais marcantes do método de detecção de transgenes, baseado na reação de PCR convencional, são a sua precisão e a sua sensibilidade. No entanto, este método é incapaz de fornecer informação acurada sobre a quantidade do alvo que está sendo amplificado devido a oscilações na eficiência de amplificação em diferentes reações, bem como nos diferentes ciclos de uma mesma reação. Estas variações estão relacionadas com o acúmulo de inibidores, perda da processividade da enzima DNA polimerase e escassez dos reagentes ao longo dos ciclos. Em especial, nos últimos ciclos da PCR os produtos de amplificação são produzidos de modo não exponencial, o que torna inviável a correlação da quantidade inicial de alvo com a quantidade de alvo amplificado no decorrer dos ciclos de amplificação.

### **3.3.3. Quantificação de Organismos Geneticamente Modificados em Alimentos**

Variações na metodologia da PCR convencional passaram a ser empregadas no início da década de 90, com o objetivo de permitir a quantificação do alvo amplificado por PCR. Um dos primeiros métodos a ser descrito foi a PCR Competitivo (STUDER *et al.*, 1998; CALLAWAY *et al.*, 2002). Esta técnica se baseia na co-amplificação do alvo e de um DNA competidor, que apresenta os mesmos sítios de anelamento para os *primers* do fragmento alvo. Assumindo-se que a quantidade inicial do competidor seja conhecida e que a eficiência de amplificação do alvo e do competidor sejam similares, a razão da quantidade dos dois produtos de amplificação, determinada em gel de eletroforese, é representativa da razão do alvo e do competidor presentes na reação. Este procedimento é bastante trabalhoso e apresenta grandes variações quando reproduzido. É necessário construir e caracterizar o DNA competidor para cada alvo a ser quantificado, pois mesmo leves

variações na eficiência de amplificação entre o alvo e o competidor pode acarretar severamente na acuracidade e precisão da quantificação. A PCR competitivo é considerado como método semi-quantitativo no sentido que necessita de um calibrador a ser comparado com a amostra em análise. Os resultados podem apenas revelar valores abaixo, similares ou superiores ao competidor.

A técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real é extremamente precisa e menos trabalhosa do que a de PCR Competitivo (HEID *et al.*, 1996). Em contraste com quantificações nos ciclos finais da PCR (end points), a PCR em tempo real monitora a reação ciclo a ciclo, associando a amplificação do alvo em cada ciclo com a emissão de uma determinada quantidade de fluorescência. A fluorescência é originada durante a hibridização do DNA alvo com sondas ou *primers* marcados com fluoróforos específicos. A intensidade de sinal emitida é proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado e aumenta exponencialmente em cada ciclo de amplificação. Deste modo, é possível monitorar a quantidade de produto gerada em cada ciclo, e durante a fase exponencial da reação, onde a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial.

Durante a fase exponencial de amplificação é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência, na qual todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado Limiar ou *threshold* e é calculado em função da quantidade de fluorescência basal (*background*). Neste ponto, o sinal de fluorescência gerado pela amostra é significativamente maior que a fluorescência basal. A quantidade de ciclos de PCR requerida para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este ponto é definido *cycle threshold* ou Ct. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação. Este valor é a base para a quantificação pela PCR quantitativo.

Várias metodologias de quantificação baseadas em PCR em tempo real vêm sendo desenvolvidas. Estas variam na especificidade do alvo de amplificação, custo e precisão. Dentre estas metodologias, podem ser citadas: *TaqMan*, *Sybr Green*, *Beacons Moleculares* e *Lux primers*.

### **3.3.3.1. Ensaio Fluorogênico da Atividade 5' Exonucleásica (Metodologia *TaqMan*)**

Uma metodologia que vem sendo largamente empregada para a quantificação de OGM em alimentos é a metodologia *TaqMan*, que além dos *primers* de PCR usuais, utiliza uma sonda fluorescente que hibridiza dentro da sequência alvo. A sonda contém um corante fluorescente ligado ao seu terminal 5' (*reporter*) e um inibidor da fluorescência (*quencher*) ligado ao seu terminal 3'. Durante o processo de amplificação, a atividade de exonuclease 5'-3' da DNA polimerase degrada a sonda, separando fisicamente o corante fluorescente do inibidor, aumentando a emissão de fluorescência. A intensidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de DNA do transgene presente na amostra (HOLLAND *et al.*, 1991). Devido ao emprego simultâneo de *primers* e sondas esta metodologia é uma das mais precisas para quantificação de OGM em alimentos.

### **3.3.3.2. Sybr Green**

Este método não necessita de sondas específicas, apenas de *primers* específicos que irão determinar o alvo de amplificação. Nos tubos de reação de PCR adiciona-se além dos componentes para a amplificação uma substância fluorescente, denominada *Sybr Green*, que se liga ao DNA dupla fita durante o seu processo de amplificação. Esta substância tem afinidade por DNA dupla fita, não havendo nenhum mecanismo de seleção das sequências no qual irá interagir, de modo que qualquer molécula dupla fita amplificada durante a reação contribuirá para o sinal de fluorescência emitido. Uma alternativa para verificação se parte da fluorescência gerada teve a participação de produtos de amplificação inespecíficos, ou até mesmo dímeros de *primers*, é a construção de uma curva de dissociação ao final da PCR. Os produtos são vagarosamente desnaturados e considerando que cada molécula de DNA dupla fita apresenta um temperatura de desnaturação específica, é possível identificar a existência de amplificação inespecífica (AMUTAN & BATEY, 1999). A intensidade da fluorescência emitida será diretamente proporcional à quantidade de DNA transgênico, alvo de amplificação, presente na amostra. Como não utiliza sonda, esta metodologia é menos precisa que a *TaqMan*.

### **3.3.3.3. Beacons Moleculares**

*Beacons Moleculares* se refere à metodologia de amplificação por PCR em tempo real, que utiliza sondas de DNA complementares à sequência alvo, além de *primers*. Diferentemente das sondas utilizadas na metodologia *TaqMan*, estas não são hidrolisadas durante a amplificação, e por isso são também conhecidas como sondas de hibridização, enquanto as utilizadas na metodologia *TaqMan* como sondas de hidrólise (ZHANG *et al.*, 2003; BUSTIN, 2000). Estas sondas apresentam nas extremidades seqüências de DNA complementares, que levam a formação de uma estrutura na forma de grampo ou alça, quando estas extremidades se pareiam. No interior da alça está localizada parte da sequência que apresenta homologia com o alvo de interesse. Similar às sondas *TaqMan* estas também apresentam um corante fluorescente ligado ao seu terminal 5' (*reporter*) e um inibidor da fluorescência (*quencher*) ligado ao seu terminal 3'. Quando há formação da alça, os dois corantes se apresentam muito próximos e não há emissão de fluorescência. Em solução, estas sondas adotam a estrutura em alça, não havendo emissão de fluorescência. Durante a PCR, com a elevação da temperatura esta estrutura se desfaz, e com a diminuição da temperatura até a ideal para anelamento dos *primers*, há a possibilidade de anelamento da sonda com a sequência alvo a ser amplificada. Neste momento, devido a separação espacial dos fluoróforos, há a emissão da fluorescência. A cada ciclo há duplicação da quantidade de alvo disponível de modo que ciclo a ciclo a intensidade de fluorescência vai aumentando proporcionalmente à quantidade de alvo. Quando ocorre um novo ciclo de amplificação, com elevação da temperatura, a sonda desnatura e se desliga da sequência alvo, havendo então queda da fluorescência emitida.

Deve haver perfeita complementaridade entre a sonda e a seqüência alvo, pois um pareamento imperfeito pode levar ao desligamento da sonda antes que se tenha terminado o ciclo de amplificação.

### **3.3.3.4. Lux Primers**

A metodologia para a quantificação por PCR em tempo real conhecida como *Lux primers* é bem recente e prática. Nesta metodologia utiliza-se apenas o par de *primers*, que irá definir o alvo de amplificação, sendo que um dos *primers* apresenta

um fluoróforo ligado no terminal 3'. Este *primer* é denominado de fluorogênico e apresenta uma pequena cauda de 4 a 6 nucleotídeos no terminal 5', que é complementar ao terminal 3'. Da mesma maneira que na metodologia *Beacons Moleculares*, uma estrutura em forma de alça é formada, porém no próprio *primer*. Nesta conformação, os *primers* se encontram em solução e não emitem fluorescência. Não há existência de um fluoróforo *quencher* nem de sondas. Neste estado, a ausência de fluorescência está relacionada com a estrutura assumida pelo *primer*. Durante a reação de PCR esta estrutura é desfeita com o aumento da temperatura, sendo então possível o pareamento dos *primers* com sua sequência alvo. À medida que a estrutura do *primer* vai se tornando mais linear há um aumento significativo na quantidade de fluorescência emitida. Deste modo, quanto maior for a incorporação dos *primers*, maior será a quantidade de fluorescência emitida. O aumento da quantidade de fluorescência emitida no decorrer dos ciclos da PCR pode ser então correlacionado com o aumento da quantidade do fragmento alvo amplificado.

#### **3.3.4. Quantificação Absoluta x Quantificação Relativa**

A determinação do número de cópias de um fragmento alvo amplificado pela técnica de PCR em tempo real pode ser realizada de modo absoluto ou relativo. Na quantificação relativa o número de cópias ou porcentagem do gene alvo em um determinado ensaio é normalizado pelo número de cópias de uma referência endógena, ou seja, um gene espécie-específico, de expressão constitutiva. Após a normalização, o número de cópias do gene alvo é determinado em relação a um calibrador, que corresponderia à amostra usada como base para resultados comparativos. O calibrador pode ser um controle não tratado ou uma amostra no tempo zero durante a condução do experimento; no caso da quantificação de alimentos GM, corresponderia aos padrões de referência que variam de 0,1% a 5% da presença do resíduo transgênico. Tanto o calibrador quanto as amostras em teste são normalizadas com relação à referência endógena.

A quantificação relativa poder ser feita usando dois métodos:

a) Método da curva padrão: Inicialmente há a necessidade de otimização e determinação da eficiência de amplificação do alvo e da referência endógena. É crucial que as amplificações do fragmento alvo e da referência sejam similares, caso

contrário os resultados podem apresentar valores sobre ou subestimados (GINZINGER *et al.*, 2002).

Assim como na quantificação absoluta, na quantificação relativa pelo método da curva padrão é necessário construir uma curva de calibração, tanto para o gene alvo como para a referência endógena. O número de cópias do alvo, normalizado pela referência endógena, é comparado ao do calibrador. Em todas as amostras experimentais, as quantidades do alvo e da referência endógena são determinadas a partir de suas respectivas curvas padrão. A quantidade do alvo é normalizada por sua divisão pela quantidade de cópias da referência endógena, ambos amplificados em cada amostra, no mesmo tubo ou placa de reação. O valor normalizado é dividido pelo valor do calibrador. Assim, o calibrador torna-se 1X da quantidade do alvo, e todas as outras quantidades são expressas como  $nX$  da diferença relativa ao calibrador. No caso do estudo do efeito de uma droga sobre a expressão de um determinado gene, por exemplo, o controle não tratado poderia ser um calibrador apropriado.

Pelo fato da quantidade da amostra ser dividida pela quantidade do calibrador, a unidade da curva padrão desaparece. Portanto, o pré-requisito principal é que as diluições do padrão utilizado sejam conhecidas. Para a quantificação relativa, qualquer estoque de RNA ou DNA contendo um alvo apropriado pode ser usado no preparo de padrões.

b) Método DCT: Este método é similar ao da curva padrão, mas utiliza uma fórmula aritmética para alcançar o mesmo resultado de quantificação relativa. Não há necessidade de curva padrão, desde de que se tenha validado a eficiência de amplificação do alvo e da referência endógena. A quantidade do alvo, normalizada para uma referência endógena e em relação ao calibrador é dada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK *et al.*, 2001)

Na quantificação absoluta, o número de cópias do fragmento alvo é dado em termos absolutos e requer quantidades absolutas de um padrão a ser utilizado na preparação da curva padrão. DNA plasmidial e RNA sintetizado *in vitro* são normalmente utilizados para preparar padrões absolutos. A concentração é medida em espectrofotômetro ( $A_{260\text{ nm}}$ ) e convertida em número de cópias, usando o peso molecular do DNA ou RNA. Essas quantidades conhecidas devem ser inicialmente determinadas por métodos independentes e, então, serem utilizadas para a

construção da curva padrão. Neste tipo de quantificação, normalmente não é empregada uma referência endógena, somente é elaborada uma curva padrão onde os valores de Ct ou intensidade de fluorescência de uma diluição seriada, são plotados com relação à quantidade presente em cada ponto da diluição.

### **3.3.5. PCR quantitativo em tempo real na quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos**

Para a quantificação do percentual de DNA GM em um determinado produto, o número de cópias do transgene é dado em função do número de cópias de um gene endógeno espécie-específico

A quantificação relativa pelo método da curva padrão é a metodologia comumente utilizada para a determinação do percentual de DNA GM presente nas amostras. O percentual de OGM é definido como sendo a razão entre a quantidade em peso do ingrediente GM com relação a quantidade total do ingrediente. No entanto, como esse percentual é, na realidade, determinado pela amplificação por PCR de um fragmento do DNA exógeno, bem como de um gene endógeno utilizado como referência, o que ocorre, na verdade, é uma extrapolação da razão entre o número de cópias de DNA GM e número de cópias de DNA não transgênico da espécie em questão, amplificados por PCR. Tanto o fragmento de DNA exógeno como o utilizado como referência endógena devem apresentar a mesma eficiência de amplificação por PCR quantitativo. Esta eficiência deve ser demonstrada inicialmente em reações simples e *multiplex*, e pela construção de curvas de calibração com valores de coeficiente de correlação acima de 0,98, e ambas eficiências acima de 90%. Durante as análises a amplificação de ambos os alvos em reações *multiplex* os desvios referentes à eficiência de amplificação são minimizados.

A quantificação relativa pelo método da curva padrão pode ser realizada pela construção de curvas de calibração independentes, uma para cada alvo, transgene e a referência endógena, ou apenas uma curva considerando a amplificação dos dois alvos. No primeiro caso, as curvas de calibração são obtidas pela amplificação de quantidades absolutas de uma amostra padrão. Moléculas de DNA recombinantes, contendo os fragmentos transgene e/ou a referência endógena clonados, podem ser utilizadas para preparar os padrões absolutos. A concentração é medida em espectrofotômetro ( $A_{260\text{ nm}}$ ) e convertida em número de cópias, usando o peso

molecular. Em ambas as curvas os valores de Ct de cada alvo são plotados em função do logaritmo da concentração ou do número de cópias. O número de cópias do transgene por cópias do genoma da espécie será obtido pela razão entre o número de cópias do transgene pelo número de cópias do gene endógeno em cada amostra. Deste modo a quantificação relativa pelo método da curva padrão é obtida pela razão entre duas quantificações absolutas.

No segundo caso, uma única curva de calibração construída utiliza os valores de delta Ct (Ct do transgene menos o Ct da referência endógena) em função do logaritmo da concentração, percentual de OGM ou número de cópias. Deste modo os valores são normalizados previamente à elaboração da curva. O percentual de OGM das amostras é diretamente obtido pela equação derivada da curva. Este método de quantificação relativa pela curva padrão muitas vezes é descrito como método do delta Ct, no entanto difere do método de quantificação relativa tradicional, em que há o emprego de uma fórmula aritmética para expressar diferenças entre a quantidade do gene alvo e amostras calibradoras em estudos de expressão gênica.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMUTAN, M. & BATEY, D. (1999). Real-time quantification of genomic DNA using DyNAzyme II DNA polymerase and SYBR Green I dye. Application Note Vol. 1, No. 1. *MJ Research, Inc.*
- ANKLAN, E.; GADANI, F.; HEINZE, P.; PIJNENBURG, H.; VAN DEN EDEE, G. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur. Food Res. Technol.* 214:3-26.
- BOURKE, M. T.; SCHERCZINGER, C. A.; LADD, C.; LEE, H. C. (1999). *J. Forensic Sci.* 44:1046-1050.
- BUSTIN, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25:169–193.
- CARRE, B.; BRILLOUET, J. M.; BEAUFILS, E. ; BERNARD, C. R. ; BOTOREL, G. ; DAUVILLIER, P. ; MAUPETIT, T. ; METRA, P. ; VIGNEROM, J. ; NOUAT, E. (1988). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72:463-467.
- CALLAWAY, A. S.; ABRANCHES, R.; SCROGGS, J.; ALLEN, G. C.; THOMPSON, W. F. (2002). High-throughput transgene copy number estimation by competitive PCR. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20:265-277.
- DUIJN, G. V.; BIERT, R. V.; MARCELIS, H. B.; PEPPELMAN, H.; HESSING, M. (1999). Detection methods for genetically modified crops. *Food Control*, 10:375–378.
- EHLERS, B.; STRAUCH, E.; GOLTZ, M.; KUBSCH, D.; WAGNER, H.; MAIDHOF H.; BENDIEK, B.; APPEL, B.; BUHK, H. J. (1997). Identification of genetically modified maize by PCR. *Bundesgesundheitsblatt.* 4: 118-121.

- GINZINGER, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30: 503-512.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6 (10): 986-94.
- HUPFER, C.; HOTZEL, H.; SACHSE, K.; ENGEL, K. H. (1998). Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z. lebensm. Unters. Forsch.* 206:203-207.
- HOLLAND, P. A.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' -3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 88:7276-7280.
- HOTZEL, H.; MÜLLER, W.; SACHSE, K. (1999). Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients. *Eur. Food Res. Technol.* 209:192-196
- JAMES, C. (2006). Global status of commercialized transgenics crops: 2004. *ISAAA Briefs* N° 34, International Services for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY.
- KRAMER M. G. ; REDENBAUGH, K. (1994). Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR tomato story. *Euphytica* 79 :293-297.
- KOPPEL, E.; STADLER, M.; LUTHY, J.; HUBNER, P. (1997). Sensitive method for the detection of the genetically engineered soybean Roundup Ready . *Mitt. Gabiete Lebensm. Hyg.* 88: 164-175.
- LIPP, M.; ANKLAM, E.; STAVE, J. W. (1999). *J. AOAC Int.* 83:919-927.

- LIPP, M.; SHILLITO, R.; GIROUX, R.; SPIEGELHALTER, F.; CHARLTON, S.; PINERO, D.; SONG, P. (2005). Polymerase Chain Reaction Technology as Analytical Tool in Agricultural Biotechnology *J. AOAC Int.* 88:136-9154.
- LIVAK, K. J. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-Ct}$  Method. *Methods*, 25:402-408.
- MEYER, R.; CHARDONNENS, F.; HUBNER, P.; LUTHY, J. (1996). Polymerase Chain Reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z Lebensm Unters Forsch A.* 203:339–344.
- MEYER, R.; JACCAUD, E. (1997). Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for specific detection of glyphosate tolerant soubeans. *Proceedings of Ninth European Conference on Food Chemistry*, 1: 23-28.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W .F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids* 8: 4321-4325.
- REMUND, K. M.; DIXON, M. A.; WRIGTH, D. L.; HOLDEN, L. R. (2001). Statistical considerations in seed purity testingn for transgenic traits. *Seed Res.* 11:101-119.
- SOLFRIZZO, M.; AVANTAGGIATO, G.; VISCONTI, A. (1998). *J. Chromatogr.* A815:67-73.
- STUDER, E.; RHYNER, C.; LUTHY, J.; HUBNER, P. (1998). Quantitative competitive PCR for detection of genetically modified soybean and maize. *Z Lebensm Unters Forsch A.* 207-207-213.
- ZHANG, Y. ; ZHANG, D. ; LI, W. ; CHEN, J. ; PENG, Y. ; CAO, W. (2003). A novel real time quantitative PCR method using attached universal template probes. *Nucleic Acids Res.* 31:123.
- ZIMMERMAN, A.; LUTHY, J.; PAULI, U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Z. Lebensm. Unters Forsh.* 207, 81-90.

ZIMMERMANN, A. LUTHY, J.; PAULI, U. (2000). Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm. Wiss. Technol.* 33: 210-216.

WINFREY, M; R.; ROTT, M. A.; WORTMAN, A. T. (1997). *In Unravelling DNA*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

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

## Capítulo I

---

### **Panorama nacional da presença de resíduos transgênicos em alimentos no período 2000-2005**

#### **RESUMO**

No período de 2000 a 2005, foram amostradas 3.944 amostras dos mais variados produtos, industrializados, *in natura* e grãos, principalmente compostas pela matriz soja, para análise de detecção de resíduos transgênicos. Nos anos iniciais, as amostras foram enviadas principalmente pelos estados da região Sul do país, principalmente Paraná e Santa Catarina. Já em 2005, 45,27% das amostras foram enviadas por clientes do estado de São Paulo. Inicialmente a demanda pela análise era concentrada principalmente em produtos *in natura* e grãos. Nos anos de 2004 e 2005, houve inversão dessa tendência: amostras de produtos processados representaram mais da metade da demanda. A elevação da demanda pela análise de produtos processados, concomitante com a elevação da demanda de amostras enviadas pelo estado de São Paulo, indica um possível efeito da publicação de decreto de rotulagem, em abril de 2003. Em 2000 apenas 5% das amostras continham resíduos de OGM, consistindo de 1,11% de amostras de farelo de soja e 3,89% soja grão. Em 2001, esse percentual subiu para 11,39% e a presença de resíduos transgênicos já foi detectada em amostras processadas de produtos matinais a base de soja. O percentual de amostras positivas atingiu 28,45% em 2002, seguida de uma redução deste valor para 28,23%, em 2003. Em 2002, outras classes de produtos processados mostraram-se positivas para a presença de resíduos transgênicos, entre estas as de condimentos e temperos, óleos e gorduras e produtos cárneos. Em 2003 as primeiras amostras de milho transgênico foram detectadas e representaram 0,80% do total de 28,29% de amostras positivas. Em 2004 o percentual sofreu uma leve redução para 25,69%, o que pode ser devido à

publicação do decreto de rotulagem em abril do ano anterior, e, no ano seguinte, 2005, o percentual de amostras positivas continuou a subir atingindo o valor de 28,17%. O aumento gradual no número de amostras positivas demonstra que mesmo quando o plantio e a comercialização de OGM eram proibidos no país, estes estavam presentes no mercado, pelo menos, desde o ano de 2000. Amostras incluídas nas classes de soja grão, farelo de soja, salchichas e empanados foram as que apresentaram as maiores proporções de resultados positivos com relação ao total de amostras analisadas dentro de cada classe. Do total de 626 amostras que tiveram os níveis de resíduos de DNA GM quantificados, cerca de 46,01% apresentou resíduos de transgênicos acima de 1,0%, sendo que 27,48% delas, acima de 5,0% do DNA total da espécie analisada.

## 1. INTRODUÇÃO

As principais culturas GM cultivadas no mundo, em 2005, em escala de predominância, foram a soja resistente ao glifosato, o milho e o algodão resistentes a inseto e/ou a herbicida, e a canola resistente a herbicida. Outras culturas, porém menos expressivas, também são ou já foram liberadas para cultivo em alguns países, dentre estas o tomate com amadurecimento tardio, a batata resistente a inseto e vírus, a chicória, o arroz e a beterraba tolerantes a herbicida e o mamão resistente a vírus. Considerando todos os eventos de vegetais GM já liberados para plantio em escala comercial, para consumo humano ou animal, mesmo que por apenas um determinado período, o total é de 83 eventos em pelo menos 27 países (Agbios Database, 2006).

No Brasil, apenas dois eventos transgênicos foram liberados para plantio e comércio, a soja resistente ao glifosato, em 2003, e o algodão resistente a inseto, em 2005. Apesar disso, grãos e farelo de soja GM têm sido detectados no país desde o ano de 2000. Grãos de milho GM foram detectados inicialmente em 2003, apesar de até o momento não ter sido liberado nem para cultivo nem para comércio no país (MARCELINO *et al.*, 2003). A análise de sementes de soja fiscalizadas e certificadas, que foram utilizadas para o plantio na safra 2002/2003, nos principais estados produtores (RS, PR, MT e MG), revelou que 19,69% das sementes analisadas, oriundas do estado do RS, eram transgênicas (PIMENTA, 2003). Segundo JAMES (2006), o Brasil foi o país que mais aumentou o cultivo de plantas

GM em 2005, passando de 5 milhões de hectares plantados em 2004 para 9,4 milhões de hectares em 2005.

A ampliação mundial de culturas GM, em especial no Brasil, reflete-se também no aumento da presença de resíduos transgênicos em produtos alimentícios. Este fato gerou a necessidade do estabelecimento de normas referentes ao direito à informação. No Brasil, uma legislação específica para rotulagem de alimentos GM foi inicialmente publicada em 2001, e estabelecia o limite de 4% para presença acidental de soja transgênica entre os grãos comercializados no país. Em 2003, mediante decreto Nº 4.680 de 25 de abril, a rotulagem passou a ser obrigatória para produtos embalados, a granel ou *in natura*, que contenham ou que sejam produzidos de OGM, a partir do limite de 1,0% do produto final.

Desde a introdução de culturas transgênicas e a publicação de normas de rotulagem no país, nenhum estudo referente à detecção e quantificação de resíduos transgênicos em alimentos, rotineiramente consumidos pela população, foi realizado. Órgãos responsáveis pela fiscalização como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério da Justiça, Ministério do Meio Ambiente, Ministério da Saúde e Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, vêm realizando trabalhos de fiscalização dos mais variados tipos de produtos, no que se refere a presença de resíduos transgênicos acima do limite de 1% do produto final, no entanto nenhuma informação existe em termos da abrangência deste trabalho.

Informações a cerca do nível médio da presença de resíduos transgênicos em diferentes tipos de produtos, compostos pelos mais variados tipos de matrizes, são importantes para dar suporte a trabalhos de fiscalização e rastreabilidade dos tipos de resíduos transgênicos que já vêm sendo consumidos pela população e por qual período.

Este trabalho tem como objetivo apresentar um quadro panorâmico dos principais tipos de produtos, compostos pelas mais variadas matrizes, em que foi detectada a presença de resíduos transgênicos dentre diversos tipos de alimentos comercializados no país, e ainda, quais destes apresentaram percentuais acima do limite estabelecido pela legislação nacional, no período de 2000 a 2005.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material de referência**

Como material de referência para determinação da concentração de resíduos de OGMs foram utilizados padrões de referência certificados (CRMs) produzidos pelo IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurement*) e comercializados pela Fluka. Os padrões contém 0,0%, 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% ou 5,0% (p/p) de farinha de soja Roundup Ready<sup>®</sup> ou milho Bt11.

### **2.2. Material para análise**

Todas as amostras foram analisadas pelo Laboratório de Análises Genéticas – AgroGenética, empresa que foi criada no sistema de Incubadora de Empresas de Base Tecnológica da Universidade Federal de Viçosa. Os produtos analisados constituem uma amostragem aleatória daqueles enviados para análise de detecção e quantificação de resíduos transgênicos por clientes nacionais, tais como, produtores, associações, portos, beneficiadora de grãos e empresas alimentícias, de diferentes regiões do país. A amostragem buscou representar a demanda dos tipos de produtos, estado de origem das amostras, matriz e tipo de análise da empresa. O material utilizado nas análises é constituído por grãos, produtos *in natura* e alimentos processados.

### **2.3. Extração de DNA**

O DNA genômico dos padrões de referência foi extraídos pelo método *PrepMan* (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante. O DNA das

amostras foi extraído pelas metodologias CTAB (ROGERS *et al.*, 1988) e Wizard™ (Promega).

A extração de DNA de produtos com alto nível de processamento foi realizada pelos métodos CTAB ou Wizard, com diferentes adaptações, segundo características específicas dos produtos. A quantidade inicial utilizada para a extração foi elevada cerca de cinco vezes em relação às amostras não processadas. Amostras com alto teor de carboidratos foram tratadas com 10 mg de amilase por 30 min a 55°C. Para amostras ricas em lipídeos, cerca de 500 mg eram tratados com 10 mL de hexano juntamente com o tampão de lise, seguida de uma precipitação adicional com glicogênio a 2 µg/mL.

#### **2.4. Oligonucleotídeos e condições de amplificação por PCR qualitativo e quantitativo**

Para a verificação da qualidade do DNA, as amostras contendo soja em sua composição foram amplificadas com os *primers* específicos para o gene da referência endógena lectina (MEYER *et al.*, 1994), as contendo milho para o gene da *delta zeína* (STUDER *et al.*, 1997), algodão para o gene que codifica a proteína carreadora acil fibra específica (MONSANTO, 2000) e as contendo canola para o gene *acetil-CoA carboxilase (ACC)* (HERNANDEZ *et al.*, 2001). Produtos para os quais nenhuma referência endógena tenha sido descrita, a qualidade do DNA foi verificada pela sua amplificação com *primers* RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*). Para a detecção da presença de resíduos GM na composição das amostras, estas foram amplificadas com *primers* específicos para a região promotora CaMV35S (EMBL AJ308514), e terminadora NOS (EMBL 308515), ambas presentes na maioria das construções transgênicas existentes. Para a identificação do evento de soja RR, foram utilizados *primers* específicos para a região promotora de CaMV35S e *primers* que pareiam na sequência que codifica o peptídeo de trânsito de *Petunia hybrida* e a região codificadora ESPS (EMBL AY592954). Para a identificação do evento de milho Bt11 ou Bt176, foram utilizados *primers* específicos para a região codificadora da endotoxina Cry1A (ZIMMERMANN *et al.*, 2000). As seqüências dos *primers*, bem como os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados estão apresentados no Quadro 1.

As reações de PCR convencional foram conduzidas em termociclador modelo 7900 (Applied Biosystems), com período inicial de desnaturação a 94°C, por 4 min, seguido por 35 ciclos de polimerização, (94°C por 30 s, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min) e período adicional de polimerização a 72°C por 7 min. Para cada par de *primers* foi utilizada a temperatura de pareamento mais apropriada. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 2,5 mmoles/L de cada dNTP, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 0,2 pmoles de cada *primer*, 0,01 ng a 2000 ng DNA molde, KCl 50 mmoles/L, Tris-HCl 10 mmoles/L pH 8,3 e MgCl<sub>2</sub> 1,5 ou 2,0 mmoles/L. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose 2,0% (p/v), contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídeo imerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mmoles/L, EDTA 1 mmoles/L pH 8,0), e visualizados por meio de luz ultravioleta.

As reações de PCR quantitativo foram efetuadas no equipamento ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As amostras contendo soja foram amplificadas com o kit *TaqMan GMO Soy 35S Detection Kit* e as contendo milho, com o *kit TaqMan GMO Maize 35S Detection Kit* (Applied Biosystems). As condições de termociclagens e concentrações dos reagentes foram realizadas conforme recomendações do fabricante. Estes kits empregam a metodologia *TaqMan* para a quantificação da soja e/ou milho GM presentes nas amostras.

## **2.5. Avaliação da demanda e perfil das amostras analisadas para a presença de resíduos transgênicos**

As amostras foram organizadas em 20 diferentes classes, de acordo com suas propriedades particulares, como composição e finalidade, e ainda, em 3 diferentes grupos de acordo com o nível de processamento das amostras: grãos, produtos *in natura* e processados.

A distribuição da frequência de cada uma das 20 diferentes classes de produtos foi apresentada anualmente, no período de 2000 a 2005. No mesmo período, as amostras foram destruídas de acordo com seus níveis de processamento e tipo de matriz(es) que as compunham.

A demanda de amostras para análise de detecção de resíduos transgênicos foi ainda avaliada em termos de distribuição por estado e percentual de amostras fiscais.

QUADRO 1 - Sequência de *primers* e sondas utilizados nas reações de PCR qualitativo

<i>Primers</i>	<i>Alvo</i>	<i>Sequência</i>	<i>Amplicon</i>
Lec-F Lec-R	Gene da lectina da soja	5´GCCCTCTACTCCACCCCATCC 3´ 5´GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG 3´	118 pb
Nos-Long F Nos Long-R	Região terminadora NOS	5´ATTGCGGGACTCTAATCATAAAA 3´ 5´ATCGTTCAAACATTTGGCAATAA 3´	180 pb
RR-F RR-R	Região codificadora EPSPS	5´TGATGTGATATCTCCACTGACG 3´ 5´TGTATCCCTTGAGCCATGTTGT 3´	172 pb
Ze1-F Ze1-R	Gene da delta zeína do milho	5´AGTGCGACCCATATTCCAG 3´ 5´GACATTGTGGCATCATCATT 3´	277 pb
Bt 11-F Bt11-R	Região codificadora Cry1Ab	5´TATCATCGACTTCCATGACCA 3´ 5´AGCCAGTTACCTTCGGAAAA 3´	128 pb
Acc1-F Acc1-F	Gene da acetyl-CoA carboxilase da canola	5´GGCGCAGCATCGGCT 3´ 5´GGTGAGCTGTATAATCGAGCGA 3´	82 pb
Acp1-F Acp1-R	Gene que codifica a proteína carreadora acil fibra específica do algodão	5´ATTGTGATGGGACTTGAGGAAGA 3´ 5´CTTGAACAGTTGTGAATGGATTGTG 3´	76 pb
35-S 35-R	Região promotora 35S do vírus do mosaico da couve flor	5´GATAGTGGGATTGTGCGTCA 3´ 5´GCTCCTACAAATGCCATCATTGCG 3´	195 pb

## 2.6. Avaliação das amostras quanto à presença de resíduos transgênicos

Os resultados referentes ao percentual de amostras positivas foi avaliado em relação ao total de amostras analisadas e em relação ao total de produtos analisados dentro de cada classe. Os dados são apresentados anualmente, durante o período de 2000 a 2005, e com valores acumulados no período de seis anos que as amostras foram analisadas.

As amostras também foram avaliadas de acordo com o tipo de metodologia empregada, qualitativa ou quantitativa, para análise de resíduos transgênicos. A partir do total de amostras positivas, que foram quantificados, foi estabelecido o

percentual e classes das amostras que apresentaram resíduos de transgênicos acima de 1% do total de DNA da espécie em questão.

Baseado nos resultados, foi traçado um perfil dos principais produtos passíveis de análise e estabelecida uma visão do percentual e tipos de produtos positivos que já se encontram no mercado brasileiro desde o ano de 2000.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Avaliação da demanda e perfil das amostras analisadas

Para a avaliação do panorama nacional da presença de resíduos transgênicos em amostras de alimentos comercializados no país, foram analisadas 3.944 amostras dos mais variados produtos, durante o período de 2000 a 2005. A distribuição das amostras no decorrer dos anos foi: 180 amostras em 2000, 439 em 2001, 730 em 2002, 751 em 2003, 1347 em 2004 e 497 em 2005. As amostras foram organizadas em 20 diferentes classes, de acordo com suas propriedades particulares, tais como composição e finalidade, e ainda em três diferentes grupos de acordo com o nível de processamento, grãos, produtos *in natura* e processados. Os produtos presentes em cada classe e o correspondente nível de processamento atribuído encontra-se no Quadro 2. Amostras com baixa demanda de análise, inferior a 0,5% do total de amostras analisadas no ano, foram classificadas como “outros”.

A demanda pela análise dos produtos presentes em cada classe foi expressa em valores percentuais com relação ao total de amostras analisadas em cada ano (Tabela 1).

Pode-se observar que inicialmente a demanda por análise concentrava-se em amostras de grãos e produtos *in natura*. Em 2000, apenas 10,56% das amostras eram constituídas por produtos processados, que consistiam de amostras de mistura para bolo, amido de milho e matinais. Do restante, cerca de 46,11% das amostras eram de produtos *in natura* e 43,33% de grãos, abrangendo principalmente as classes de soja grão, proteína e farelo de soja.

QUADRO 2 – Classificação dos produtos analisados e nível de processamento.

Classes de Produtos	Produtos	Nível de Processamento
Amido de Milho	Amido de Milho	Processado
Bebidas Lácteas	puddings, cremes de vários sabores, fermentados	Processado
Biscoitos	Maizena, água e sal, recheado, wafer	Processado
Condimentos e Temperos	Pimenta, realçador de sabor, caldo de carne e galinha em tabletes, molho de soja, molho shoyo, coentro em pó, cebola em pó	Processado
Empanados	Peito de frango empanado, embutidos	Processado
Farelo de Soja	Farelo de Soja	<i>In natura</i>
Fubá	Fubá de milho	<i>In natura</i>
Lecitina	Lecitina de soja	<i>In natura</i>
Macarrão e massas	Espaguete, sêmola, talharim, macarrão instantâneo	Processado
Matinais	Achocolatados e shakes a base de soja, extrato hidrossolúvel de soja	Processado
Mistura para empanados	Ligante para empanados, breeding, Intermediário, tempura batter,	Processado
Mistura para bolo	Mistura para bolos de diferentes sabores e marcas	Processado
Milho Grão	Milho Grão	Grão
Óleos e Gorduras	Óleo de soja, gordura vegetal, gordura hidrolisada, margarina, óleo essencial de louro e cravo	Processado
Outros	Semente de braquiária, sorgo grão, ovo desidratado, cacau em pó, barra de cereais, amido de batata, glúten de trigo, leite fermentado, batata chips, trigo grão, algodão grão, óleo de canola,	Todas as três classes
Produtos Cárneos	Patê, chester, peito de frango e peru, linguiça, mortadela, presunto, pernil, almôndegas	Processado
Ração	Ração	<i>In natura</i>
Salsicha	Salsicha e salsichão	Processado
Soja Grão	Soja grão	Grão
Produtos Proteicos de Soja	Proteína isolada, proteína texturizada, extrato protéico, farinha integral de soja, fibra de soja	<i>In natura</i>

TABELA 1 – Percentual de cada classe de produtos analisados para detecção de resíduos transgênicos durante o período 2000-2005.

Classes de Produtos Analisados	Percentual de cada Classe de Produtos Analisados											
	2000		2001		2002		2003		2004		2005	
	Total	(%)	Total	(%)	Total	(%)	Total	(%)	Total	(%)	Total	(%)
Amido de Milho	0	0,00	0	0,00	0	0,00	65	8,66	22	1,63	10	2,01
Bebidas Lácteas	0	0,00	0	0,00	0	0,00	8	1,07	18	1,34	12	2,41
Biscoitos	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	16	1,19	12	2,41
Condimentos e Temperos	0	0,00	2	0,46	11	1,50	17	2,26	95	7,05	12	2,41
Empanados	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,0	23	1,71	10	2,01
Farelo de Soja	17	9,44	41	9,34	106	14,50	90	11,98	59	4,38	23	4,63
Farinha de Trigo	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	70	5,20	69	13,88
Fubá de Milho	0	0,00	0	0,00	0	0,00	7	0,93	0	0,00	0	0,00
Lecitina	6	3,33	13	2,96	8	1,09	0	0,00	5	0,37	3	0,60
Matinais	6	3,33	21	4,78	27	3,69	8	1,07	56	4,16	23	4,63
Macarrão e Massas	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,0	27	2,00	4	0,80
Milho Grão	24	13,33	70	15,95	57	7,80	108	14,38	337	25,02	130	26,16
Mistura para Bolo	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	44	3,27	14	2,82
Mistura para Empanados	12	6,67	0	0,00	0	0,00	24	3,20	132	9,80	12	2,41
Óleos e Gorduras	0	0,00	1	0,23	5	0,68	5	0,67	35	2,60	2	0,40
Outros	22	12,22	45	10,25	34	4,65	34	4,53	95	7,05	42	8,45
Produtos Cárneos	0	0,00	5	1,14	92	12,59	14	1,86	22	1,63	5	1,01
Ração	2	1,11	37	8,43	53	7,25	47	6,26	68	5,05	22	4,43
Salsicha	0	0,00	0	0,00	0	0,00	35	4,66	90	6,68	62	12,47
Soja Grão	54	30,00	96	21,87	142	19,43	104	13,85	33	2,45	19	3,82
Sopas	0	0,00	4	0,91	17	2,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Sucos Naturais	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	0,67	0	0,00	3	0,60
Produtos Protéicos de Soja	37	20,56	104	23,69	179	24,49	180	23,97	100	7,42	8	1,61
<b>Total</b>	<b>180</b>		<b>439</b>		<b>731</b>		<b>751</b>		<b>1.347</b>		<b>497</b>	<b>3.944</b>

Ainda no ano de 2000, destacaram-se entre os produtos processados, a demanda pela análise de amostras de mistura para bolos, constituindo 6,67% do total de produtos analisados.

Em 2001, quando o primeiro decreto de rotulagem foi publicado, que estabelecia o limite de 4% para a contaminação acidental de soja RR, apenas em produtos embalados, o percentual da demanda de produtos processados não ultrapassou a 15,5%. A demanda de análise para produtos *in natura* apresentou uma leve redução, para cerca de 46,24%, mas continuou superando a demanda pela análise de grãos, que ficou em 38,27%. Naquele ano, pela primeira vez, houve a demanda pela análise de produtos cárneos, correspondendo a 1,14% do total de produtos analisados, no entanto, dentre os produtos processados as amostras de produtos matinais foram as que mais se destacaram, com 4,78% do total de amostras analisadas.

Em 2002, a demanda pela análise de produtos *in natura* continuou se elevando, e atingiu seu clímax, superando cerca de 50% do total de amostras analisadas naquele ano. A queda deste percentual ocorreu nos três anos seguintes, atingindo os percentuais 45,41%, 19,15% e 15,29% nos anos 2003, 2004 e 2005, respectivamente. Naquele ano as classes de produtos cárneos foi a superior entre os produtos processados, seguida da classe de hidrolisados de soja, atingindo os percentuais de 12,59% e 3,69% respectivamente.

Em 2003, ano de primeira liberação do comércio da soja RR plantada ilegalmente no país e também da publicação do novo decreto de rotulagem, que estabeleceu o limite de 1% da presença de resíduos transgênicos, tanto para os produtos embalados como os comercializados a granel, o percentual da demanda de análise por produtos processados atingiu 26,23%. Dentre a demanda de produtos analisados naquele ano percebe-se uma diversificação dos tipos de produtos, dentre estes destacam-se as amostras de salsicha, amido de milho e misturas para empanados, que atingiram os percentuais de 4,66%, 8,66% e 3,20% do total de amostras analisadas, respectivamente.

Em 2004, ano posterior à publicação do decreto de rotulagem, a demanda pela análise de produtos processados atingiu o percentual de 51,97% do total de amostras analisadas, com uma leve elevação no ano seguinte, 2005, para 53,72%. Em contrapartida à elevação do percentual de análise de produtos processados, a

Ainda no ano de 2000, destacaram-se entre os produtos processados, a demanda pela análise de amostras de mistura para bolos, constituindo 6,67% do total de produtos analisados.

Em 2001, quando o primeiro decreto de rotulagem foi publicado, que estabelecia o limite de 4% para a contaminação acidental de soja RR, apenas em produtos embalados, o percentual da demanda de produtos processados não ultrapassou a 15,5%. A demanda de análise para produtos *in natura* apresentou uma leve redução, para cerca de 46,24%, mas continuou superando a demanda pela análise de grãos, que ficou em 38,27%. Naquele ano, pela primeira vez, houve a demanda pela análise de produtos cárneos, correspondendo a 1,14% do total de produtos analisados, no entanto, dentre os produtos processados as amostras de produtos matinais foram as que mais se destacaram, com 4,78% do total de amostras analisadas.

Em 2002, a demanda pela análise de produtos *in natura* continuou se elevando, e atingiu seu clímax, superando cerca de 50% do total de amostras analisadas naquele ano. A queda deste percentual ocorreu nos três anos seguintes, atingindo os percentuais 45,41%, 19,15% e 15,29% nos anos 2003, 2004 e 2005, respectivamente. Naquele ano as classes de produtos cárneos foi a superior entre os produtos processados, seguida da classe de hidrolisados de soja, atingindo os percentuais de 12,59% e 3,69% respectivamente.

Em 2003, ano de primeira liberação do comércio da soja RR plantada ilegalmente no país e também da publicação do novo decreto de rotulagem, que estabeleceu o limite de 1% da presença de resíduos transgênicos, tanto para os produtos embalados como os comercializados a granel, o percentual da demanda de análise por produtos processados atingiu 26,23%. Dentre a demanda de produtos analisados naquele ano percebe-se uma diversificação dos tipos de produtos, dentre estes destacam-se as amostras de salsicha, amido de milho e misturas para empanados, que atingiram os percentuais de 4,66%, 8,66% e 3,20% do total de amostras analisadas, respectivamente.

Em 2004, ano posterior à publicação do decreto de rotulagem, a demanda pela análise de produtos processados atingiu o percentual de 51,97% do total de amostras analisadas, com uma leve elevação no ano seguinte, 2005, para 53,72%. Em contrapartida à elevação do percentual de análise de produtos processados, a

demanda pela análise de produtos *in natura* apresentou radical queda, passando de 45,41% em 2002 para 15,29% em 2005. A demanda pela análise de grãos apresentou uma tênue elevação, passando de 27,22% em 2002 e atingindo 30,99% em 2005. A demanda pela análise dos produtos classificados em cada nível de processamento, no período de 2000 a 2005, pode ser observada na Figura 1.

A elevação da demanda pela análise de produtos processados, principalmente nos anos de 2004 e 2005, anos posteriores à publicação do decreto de rotulagem, pode ser interpretada como sendo reflexo deste. Embora não se tenham dados concretos se a fiscalização tenha efetivamente se intensificado no país, percebeu-se uma maior atenção pelas empresas que utilizam soja e/ou milho na constituição de seus produtos, em relação à rastreabilidade e percentuais de resíduos de OGM em seus produtos.

Do total de 3.494 amostras analisadas durante o período, apenas 74 amostras, representando em torno de 1,90% do total, foram análises fiscais, ou seja, enviadas pelos órgãos federais responsáveis pela fiscalização da presença de resíduos transgênicos no país. Deste modo, é ainda questionável quais fatores têm levado à demanda pela análise de detecção de OGMs em alimentos, se a legislação vigente ou preferência do mercado consumidor que, de modo geral, ainda não é favorável ao consumo de OGM.

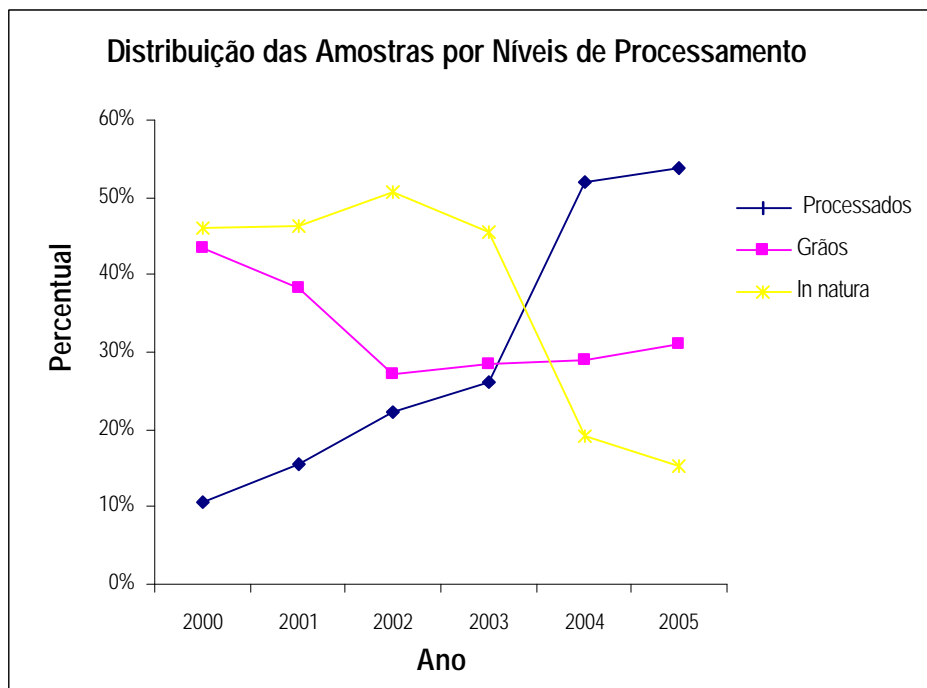


FIGURA 1 – Percentual de produtos analisados de acordo com os níveis de processando no período de 2000 a 2005.

Em 2004 e 2005, a diversificação dos tipos de produtos analisados foi similar a 2003. Em 2004, destacaram-se entre os produtos processados as classes das amostras de misturas para empanar, condimentos e temperos com percentuais de 9,80% e 7,05%, respectivamente, e, em 2005, as classes de farinha de trigo e salsichas com os percentuais de 13,88% e 12,47%, respectivamente.

No ano de 2005 também foi observada uma queda no número de amostras analisadas, e conseqüentemente refletiu numa menor amostragem de produtos para serem analisados. Tal fato pode ser reflexo da liberação da soja RR no país desde a publicação da nova Lei de Biossegurança, em março de 2005, ou mesmo devido ao grande período em que a CTNBio esteve sem atuar, até a publicação do decreto 5.591, em novembro de 2005, que regulamentou a lei.

### **3.2. Tipos de matrizes**

Durante o período de seis anos em que as amostras foram analisadas para a detecção e quantificação de resíduos transgênicos, a principal demanda foi de amostras que apresentavam soja em sua composição, atingindo o percentual médio de 60,47% do total de amostras analisadas durante todo o período. No entanto, a partir de 2003, a demanda por amostras que apresentam apenas a matriz soja em sua composição decresceu, passando do percentual de 80,16% em 2002, 64,18% em 2003, 40,68% em 2004, e 34,41% em 2005. A distribuição das amostras por tipo de matriz no decorrer dos anos em que estas foram analisadas está apresentada na Figura 2.

Como esperado, a demanda pela análise de amostras que apresentavam milho em sua composição foi imediatamente inferior à dos produtos que continham soja, atingindo o percentual médio de 25,43% do total de amostras analisadas no período. A terceira maior demanda foi pela análise de amostras que continham as duas matrizes em sua composição, que atingiu o percentual médio de 18,18%.

Grãos e produtos contendo soja RR em sua composição foram somente liberados para comércio no país em 2003, no entanto, a demanda pela análise desses produtos já havia se iniciado bem anteriormente, inclusive de produtos que apresentavam além de soja, outras matrizes em sua composição, como por exemplo, as contendo milho ou ambos. A demanda pela detecção de milho transgênico ocorreu no mesmo ano em que foram feitas as primeiras análises de

soja, em 2000. Neste ano o percentual de amostras analisadas que apresentavam soja em sua composição foi de 76,67% comparados com apenas 15,56% das amostras de milho. No decorrer dos seis anos houve elevação da demanda de amostras de milho, com exceção do ano de 2002, e culminou com o estabelecimento de níveis similares da demanda para as duas matrizes em 2005, em 34,41% para soja e 30,58% para milho.

A demanda de análise de produtos que apresentavam milho e soja em sua composição também foi se elevando durante o período, estando em 2000 em cerca de 7,78% e atingindo, em 2005, 18,91% do total de amostras analisadas.

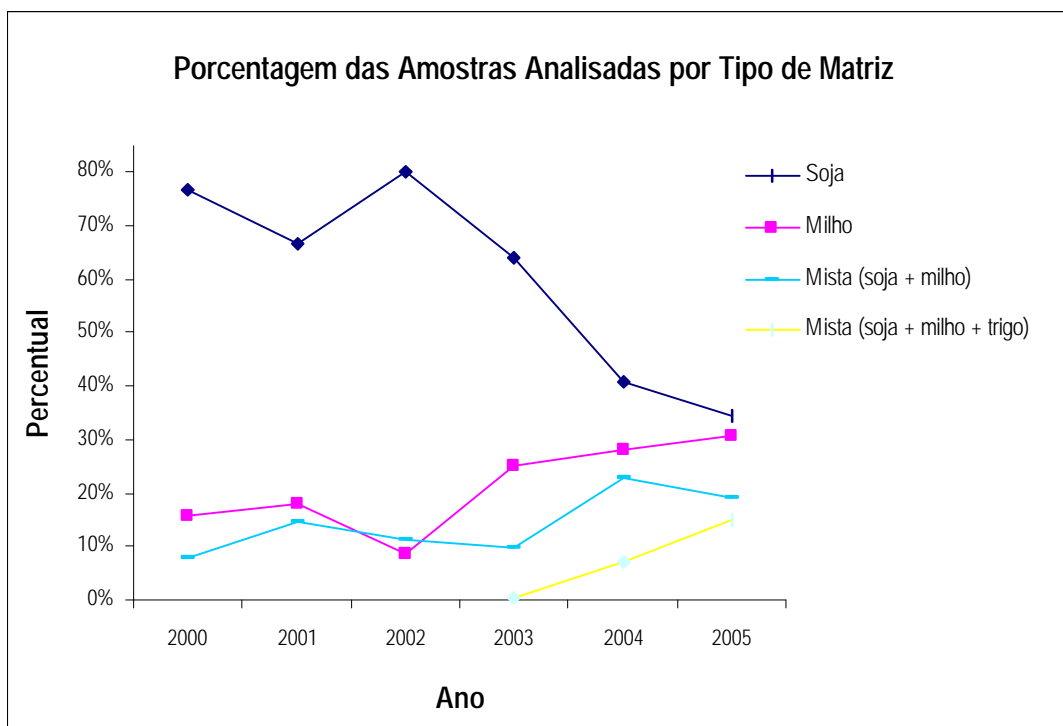


FIGURA 2 – Percentual de produtos analisados de acordo com o tipo de matriz no período de 2000 a 2005.

A demanda pela análise de produtos que contêm simultaneamente as matrizes soja, milho e trigo iniciou em 2003, inicialmente correspondendo apenas a 0,40% do total de amostras, e, atingindo, em 2005, 15,09%. Embora não haja nenhum evento de trigo GM liberado para plantio e comércio no mundo, percebeu-se a maior frequência pela demanda de análise de amostras contendo esta matriz, principalmente caracterizada pelas amostras de farinha de trigo, que corresponderam a 13,88% do total de amostras analisadas em 2005. Um fato que parece ter

contribuído para elevação desta demanda é a ocorrência de contaminação cruzada durante as etapas de colheita, transporte e processamento de grãos de trigo com grãos de soja GM nos Estados do Sul do país, onde as duas culturas são plantadas lado a lado ou no estilo de rotação de culturas. Os níveis de contaminação dos grãos de trigo com grãos de soja podem chegar a cerca de 5% (comunicação pessoal). A utilização de grãos de soja no processo de branqueamento da farinha também é um fator que justifica a presença desta matriz em produtos a base de trigo. Deste modo tornou-se possível a detecção de resíduos de soja RR em amostras de farinha de trigo. Atualmente, há em trigo apenas três eventos com alterações genética obtidas por mutagênese química, que oferecem resistência ao herbicida imidazolina (AgdataBios, 2006).

A análise de produtos contendo outras matrizes que já apresentam eventos GM liberados em alguns países, como batata, canola, algodão e arroz foi verificada no decorrer dos cinco anos, no entanto, a frequência foi bastante baixa e nenhuma das amostras contendo estas matrizes apresentou resultado positivo para a presença de resíduos de transgênicos.

### **3.3. Demanda pela análise por região do país**

No período de seis anos, de 2000 a 2005, foram analisadas 3.944 enviadas de diferentes regiões do país e por clientes dos mais variados tipos de perfis, desde produtores de médio e grande porte, empresas que utilizavam soja e/ou milho na composição de seus produtos, portos, cooperativas e criadores de animais.

A distribuição da demanda de amostras para análise de detecção e quantificação de resíduos transgênicos por estado, no período de 2000 a 2005, pode ser observada na Tabela 2. De acordo com os resultados, os principais estados em que houve demanda para análises de resíduos de transgênicos, durante todos os anos em que estas foram conduzidas, foram Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Bahia. Os estados do Ceará e Goiás esporadicamente tiveram uma demanda um pouco mais significativa que os estados do Amazonas, Espírito Santo, Pernambuco e Mato Grosso.

Segundo dados da CONAB, os principais estados produtores de soja no país são, em ordem de produção, Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais. Todos estes estados apresentaram alguma demanda para análise de transgênicos, sendo que o estado de Santa Catarina foi o que mais se destacou em

número de amostras enviadas para análise (1.440), seguido do estado de São Paulo (1.211). Em contrapartida, o estado de Mato Grosso, embora seja o maior produtor de soja do país, contribuiu de modo incipiente no total de amostras analisadas, o que pode ser inferido pelo fato do estado ser o que mais utiliza sementes de soja fiscalizada. Na safra 2001/2002, 95% das sementes utilizadas para plantio foram certificadas, o que reduz a probabilidade de transgênicos na região (PIMENTA 2003). Embora o estado do Rio Grande do Sul não tenha se destacado pela demanda de análise, segundo estimativas da Associação Brasileira de Produtores de Sementes (ABRASEM), este estado é o que apresenta o maior índice de utilização de soja transgênica nos últimos anos.

Nos anos iniciais em que as amostras foram analisadas, estas foram principalmente enviadas por clientes de estados da região Sul do país, destacando-se o estado do Paraná em 2000 e 2001, responsável pela demanda de 64,44% e 47,84% das amostras enviadas para análise, respectivamente, e Santa Catarina em 2002 e 2003, com a demanda de 51,64% e 47,00% , respectivamente.

Durante todo o período percebeu-se um aumento gradativo do percentual de amostras enviadas por clientes do estado de São Paulo, sendo responsável em 2000 por apenas 10% das amostras enviadas para análise e atingindo os valores de 44,91% e 45,27% do total de amostras em 2004 e 2005, respectivamente. Em contrapartida, os estados de Santa Catarina e Paraná apresentaram um declínio acentuado durante o mesmo período, atingindo os percentuais de 33,78% e 7,72% em 2004, 20,72% e 16,90% em 2005, respectivamente.

Tal panorama pode ser compreendido pela ocorrência da normatização de questões referentes à rotulagem, que passou a exigir a informação referente ao percentual da presença de resíduos transgênicos a partir do produto final, tanto para produtos a granel como para embalados. Deste modo, um maior número de empresas que utilizavam alguma matriz potencialmente GM, na sua grande maioria no estado de São Paulo, passou a se preocupar com os níveis destes resíduos em suas amostras nas prateleiras dos supermercados. Tal fato corrobora com a distribuição da demanda de produtos de acordo com os níveis de processamento, que atingiu os percentuais mais elevados de 51,97% e 53,72%, em 2004 e 2005, respectivamente. Em contrapartida à elevação do percentual de análise de produtos processados, a demanda pela análise de produtos *in natura* apresentou radical queda no mesmo período, passando de 45,41% em 2002 para 15,29% em 2005.

TABELA 2 - Distribuição da demanda de amostras para análise de detecção e quantificação de resíduos transgênicos por Estado no período de 2000 a 2005.

ESTADO	2000		2001		2002		2003		2004		2005	
	Número de Amostras	%	Número de Amostras	%	Número de Amostras	%	Número de Amostras	%	Número de Amostras	%	Número de Amostras	%
AM	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,27	1	0,07	2	0,40
BA	0	0,00	16	3,64	0	0,00	0	0,00	83	6,16	23	4,63
CE	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	15	1,11	17	3,42
ES	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,13	1	0,07	0	0,00
GO	4	2,22	0	0,00	0	0,00	3	0,40	10	0,74	1	0,20
MG	7	3,89	33	7,52	1	0,14	9	1,20	28	2,08	28	5,63
MS	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,27	0	0,00	0	0,00
MT	0	0,00	0	0,00	1	0,14	0	0,00	0	0,00	0	0,00
PR	116	64,44	210	47,84	146	20,00	112	14,91	104	7,72	84	16,90
PE	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,22	1	0,20
RS	13	7,22	20	4,56	100	13,70	71	9,45	42	3,12	13	2,62
SC	22	12,22	100	22,78	377	51,64	353	47,00	455	33,78	103	20,72
SP	18	10,00	60	13,67	105	14,38	198	26,36	605	44,91	225	45,27
<b>TOTAL</b>	<b>180</b>		<b>439</b>		<b>730</b>		<b>751</b>		<b>1347</b>		<b>497</b>	

### **3.4. Avaliação das amostras quanto a presença de resíduos transgênicos**

Ao longo dos anos em que grãos e diferentes tipos de alimentos *in natura* e processados foram analisados para a presença de resíduos GM, pôde-se observar um aumento gradual no número de amostras positivas, demonstrando que mesmo quando o plantio e a comercialização de OGM eram proibidos no país, estes de alguma forma estavam presentes no mercado, pelo menos, desde o ano de 2000.

Em 2000 apenas 5% do total das amostras analisadas foram positivas. Em 2001, esse percentual subiu para 11,39%, e atingiu o percentual de 28,45% em 2002. Em 2003 o percentual permaneceu constante em torno de 28,23%, sofrendo uma leve redução em 2004 para 25,69%, o que pode ser devido à publicação do decreto de rotulagem em abril do ano anterior ou devido a um maior volume de amostras analisadas durante este ano, totalizando 1.347 amostras. No ano seguinte, 2005, o percentual de amostras positivas continuou a subir atingindo o valor de 28,17%. A distribuição do percentual de amostras positivas com relação ao total de amostras analisadas durante os seis anos, bem como a distribuição deste percentual dentro de cada grupo de produto (grãos, *in natura* e processados) pode ser observada na Figura 3.

A cada ano foi possível determinar quais classes de produtos contribuíram para elevação do percentual de amostras positivas com relação ao total de amostras analisadas no ano, conforme os dados apresentados na Tabela 3.

Em 2000, apenas duas classes de produtos, farelo de soja e soja grão, apresentaram amostras positivas, consistindo de 1,11% e 3,89% do total de amostras analisadas, e conseqüentemente responsáveis pelo total de 5,0% de amostras positivas detectadas naquele ano. Estas duas classes apresentaram amostras positivas durante todo o período em que as amostras foram analisadas, sendo que grandes variações nos percentuais de amostras positivas foram observadas. Até 2003 estas duas classes apresentaram o maior número de amostras positivas com relação ao total de amostras analisadas, sendo o valor mais elevado para as amostras da classe de soja grão detectado em 2001, representando 7,74% do total de 11,39% de amostras positivas detectadas no ano, enquanto as da classe de farelo de soja em 2002, representando 7,93% do total de 28,45% de amostras positivas detectadas naquele ano. Estes dados evidenciam que o Brasil

cultivou soja GM de forma ilegal durante o período de 2000 a 2005, parte desta soja provavelmente contrabandeada de países onde sua liberação já havia ocorrido na época, como a Argentina. Esta situação culminou com a publicação das Leis Nº 10.688, Nº 10.814 e Nº 11.092, nos anos 2000, 2004 e 2005 respectivamente, autorizando a comercialização da safra. Apenas em março de 2005, com a publicação da nova Lei de Biossegurança Nº 11.105, foi que a soja resistente ao glifosato passou a ser cultivada e comercializada legalmente no país. No entanto, qualquer produto que contenha resíduos transgênicos acima de 1% do produto final deve trazer esta informação no rótulo para conhecimento do consumidor.

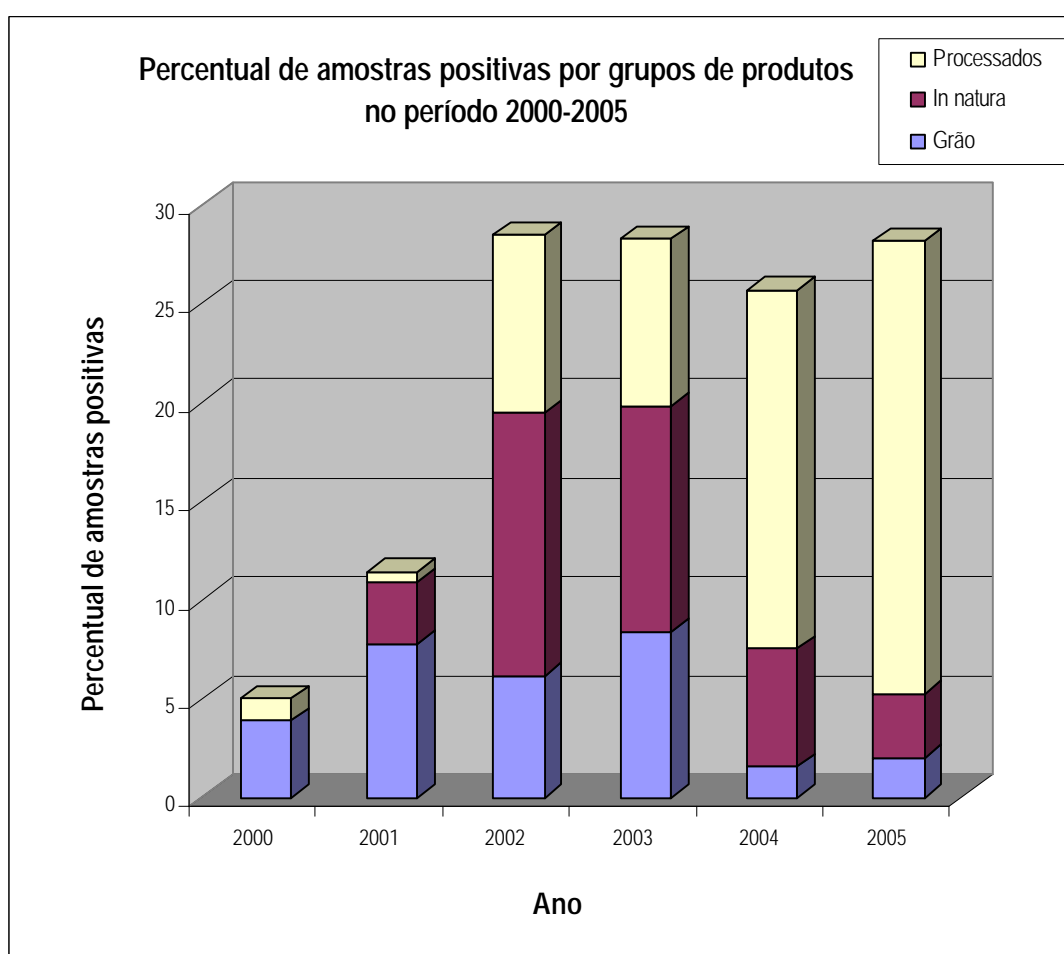


FIGURA 3 – Distribuição percentual de amostras positivas para a presença de resíduos transgênicos, por grupo de produtos, com relação ao total de amostras analisadas durante o período de 2000 a 2005.

A partir de 2001, além destas duas classes, amostras incluídas na classe ração também passaram a apresentar amostras positivas para a presença de resíduos transgênicos anualmente, sendo que no ano de 2002 este número atingiu seu clímax, representando 3,56% do total de amostras analisadas. Nos três anos seguintes em que as amostras foram analisadas, o percentual de amostras positivas nesta classe foi decaindo gradativamente, apresentando os percentuais de 1,73%, 1,41% e 0,80% de amostras positivas com relação ao total de amostras analisadas nos anos 2003, 2004 e 2005, respectivamente.

Em 2001, as primeiras amostras incluídas no grupo de produtos processados, representada pela classe de matinais, apresentou resultado positivo para a presença de resíduos transgênicos. Naquele ano estas amostras contribuíram com 0,23% do total de 11,39% de amostras positivas detectadas. Em 2002, outras classes de produtos processados passaram a apresentar resíduos transgênicos, são elas: condimentos e temperos, óleos e gorduras e produtos cárneos. As amostras de produtos cárneos se destacaram, representando 7,93% do total de 28,45% de amostras positivas detectadas no ano. Ainda em 2002, além da classe ração, as classes produtos protéicos de soja e lecitina, representando o grupo de produtos *in natura*, apresentaram os percentuais de 0,96% e 0,82% de amostras positivas, respectivamente.

Em 2003, as primeiras amostras de milho transgênico foram detectadas e representaram 0,80% do total de 28,23% de amostras positivas detectadas no ano. Nos dois anos seguintes, 2004 e 2005, amostras de milho GM continuaram a ser detectadas, atingindo os percentuais de 0,52% e 1,61% do total de amostras analisadas, respectivamente. Amostras processadas contendo a matriz milho em sua composição, como as de fubá de milho, analisadas em 2003, e as de amido em 2004 e 2005, também apresentaram milho GM em sua composição, sendo responsáveis por 0,13%, 0,67% e 0,60% das amostras positivas detectadas nos respectivos anos. Até a presente data, nenhum evento de milho GM tem autorização para ser cultivado ou comercializado no país. Apenas em abril de 2004, a CTNBio aprovou a importação de 400.000 toneladas de milho GM, para os eventos, Bt11, *LibertyLink* e NK603, pela Associação Avícola de Pernambuco. No entanto, todo o carregamento deveria apenas ser utilizado como ração e para consumo próprio da associação (Parecer 530 da CTNBio/2004).

TABELA 3 - Distribuição de amostras positivas com relação ao total de amostras analisadas durante o período de 2000-2005.

Produtos	2000				2001				2002			
	N	Negativo	Positivo	% (Positivo/total)	N	Negativo	Positivo	% (Positivo/total)	N	Negativo	Positivo	% (Positivo/total)
Amido de Milho	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Bebidas Lácteas	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Biscoitos	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Condimentos e Temperos	0	0	0	0,00	2	2	0	0,00	11	7	4	0,55
Empanados	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Farelo de Soja	17	15	2	1,11	41	35	6	1,37	106	48	58	7,93
Farinha de Trigo	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Lecitina	6	6	0	0,00	13	13	0	0,00	8	2	6	0,82
Macarrão e Massas	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Matinais	6	6	0	0,00	21	20	1	0,23	27	27	0	0,00
Milho Grão	24	24	0	0,00	0	0	0	0,00	57	57	0	0,00
Mistura para Bolo	12	12	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Mistura para Empanados	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Óleos e Gorduras	0	0	0	0,00	1	1	0	0,00	5	3	2	0,27
Outros	22	22	0	0,00	45	44	1	0,23	34	32	2	0,27
Produtos Cárneos	0	0	0	0,00	5	5	0	0,00	92	34	58	7,93
Ração	2	2	0	0,00	37	29	8	1,82	53	27	26	3,56
Salsicha	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Soja Grão	54	47	7	3,89	96	62	34	7,74	142	97	45	6,16
Sopas	0	0	0	0,00	4	4	0	0,00	17	17	0	0,00
Sucos Naturais	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Produtos Protéicos de Soja	37	37	0	0,00	104	104	0	0,00	179	172	7	0,96
<b>Total</b>	<b>180</b>	<b>171</b>	<b>9</b>	<b>5,00</b>	<b>439</b>	<b>389</b>	<b>50</b>	<b>11,39</b>	<b>731</b>	<b>523</b>	<b>208</b>	<b>28,45</b>

N – número de amostras analisadas

continuação da Tabela 3

Produtos	2003				2004				2005			
	N	Negativo	Positivo	% (Positivo/total)	N	Negativo	Positivo	% (Positivo/total)	N	Negativo	Positivo	% (Positivo/total)
Amido de Milho	65	65	0	0,00	22	13	9	0,67	10	7	3	0,60
Bebidas Lácteas	8	8	0	0,00	18	14	4	0,30	12	12	0	0,00
Biscoitos	0	0	0	0,00	16	16	0	0,00	12	7	5	1,01
Condimentos e Temperos	17	7	10	1,33	95	65	30	2,23	12	11	1	0,20
Empanados	0	0	0	0,00	23	13	10	0,74	10	0	10	2,01
Farelo de Soja	90	39	51	6,79	59	38	21	1,56	23	12	11	2,21
Farinha de Trigo	0	0	0	0,00	70	48	22	1,63	69	61	8	1,61
Fubá de Milho	7	6	1	0,13	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Lecitina	0	0	0	0,00	5	4	1	0,07	3	2	1	0,20
Macarrão e Massas	0	0	0	0,00	27	11	16	1,19	4	2	2	0,40
Matinais	8	5	3	0,40	56	52	4	0,30	23	17	6	1,21
Milho Grão	108	102	6	0,80	337	330	7	0,52	130	122	8	1,61
Mistura para Bolo	0	0	0	0,00	44	29	15	1,11	14	8	6	1,21
Mistura para Empanados	24	16	8	1,07	132	82	50	3,71	12	1	11	2,21
Óleos e Gorduras	5	5	0	0,00	35	25	10	0,74	2	2	0	0,00
Outros	34	29	5	0,67	95	84	11	0,82	42	38	4	0,80
Produtos Cárneos	14	6	8	1,07	22	10	12	0,89	5	2	3	0,60
Ração	47	34	13	1,73	68	49	19	1,41	22	18	4	0,80
Salsicha	35	6	29	3,86	90	38	52	3,86	62	7	55	11,07
Soja Grão	104	47	57	7,59	33	19	14	1,04	19	17	2	0,40
Sopas	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
Sucos Naturais	5	5	0	0,00	0	0	0	0,00	3	3	0	0,00
Produtos Protéicos de Soja	180	159	21	2,80%	100	61	39	2,90	8	8	0	0,00
<b>Total</b>	<b>751</b>	<b>539</b>	<b>212</b>	<b>28,23</b>	<b>1347</b>	<b>1001</b>	<b>346</b>	<b>25,69</b>	<b>497</b>	<b>357</b>	<b>140</b>	<b>28,17</b>

N – número de amostras analisadas

Nos anos de 2004 e 2005, a diversificação das classes de produtos que apresentavam resíduos transgênicos ampliou-se, destacando-se as amostras da classe salsicha, que desde 2003, quando foram inicialmente analisadas, passaram a apresentar amostras positivas, atingindo o percentual de 11,07% do total de 28,07% de amostras positivas detectadas em 2005.

A partir de 2004 também se iniciou a demanda pela análise de amostras de farinha de trigo, composta pelas matrizes soja, milho e trigo. A partir da análise evento específica foi possível detectar tanto soja como milho GM compondo o produto. Em 2004, amostras de farinha de trigo contendo resíduos transgênicos atingiram 1,63% do total de amostras analisadas. Este percentual praticamente permaneceu o mesmo em 2005, em 1,61%.

Os percentuais acumulados de amostras positivas com relação ao total de amostras analisadas dentro de cada classe, no decorrer dos seis anos, também foram determinados (Tabela 4). Esta informação, aliada ao percentual acumulado da demanda destes produtos no mesmo período, permite obter valores reais da distribuição de amostras positivas em cada classe de produto, uma vez que a distribuição do número de amostras não foi constante durante os anos, mas em função da demanda das mesmas.

De acordo com os resultados, as principais classes de produto analisadas durante os seis anos estão concentradas nas amostras de grãos e produtos *in natura*. Estas classes foram, de acordo com ordem de predominância, milho grão (18,41%), diferentes produtos protéicos de soja (15,42%), soja grão (11,36%) farelo de soja (8,52%) e ração (5,81%). Considerando o nível de predominância, a classe de farelo de soja e soja grão foram as que mais se destacaram com relação ao percentual de amostras positivas por classe, atingindo os valores de 44,35% e 35,49%, respectivamente. Em contrapartida, as amostras de milho grão apresentaram um baixo percentual de amostras positivas dentro da classe, apenas 2,89%, o que representa apenas 21 amostras positivas do total de 726 amostras analisadas, uma vez que a predominância da demanda por este tipo de amostra foi a mais elevada, se considerando o total de amostras analisadas nos seis anos.

Dentre os produtos processados, a demanda de análise de amostras da classe de salsicha foi a que mais se destacou, atingindo o total de 4,74% do total de amostras analisadas. Da mesma forma, o percentual de amostras positivas dentro desta classe também foi significativamente mais elevado, superando o total de 72%

das amostras de salsichas analisadas. Na classe de produtos cárneos, com predominância de 3,50% do total de produtos analisados, o percentual de amostras positivas com relação ao total de amostras da classe, também superou o percentual acumulado de 50%.

Excetuando-se as amostras pertencentes às classes de sucos naturais e sopas, pelo menos uma amostra positiva para a presença de resíduos de transgênicos foi detectada dentro de cada classe em um determinado momento.

### **3.5. Demanda de Análise Qualitativa x Análise Quantitativa**

O Laboratório de Análises Genéticas passou a receber amostras para análise de resíduos de transgênicos a partir do ano 2000. Inicialmente o Laboratório somente oferecia o serviço de detecção de transgênicos, iniciando as análises de quantificação destes resíduos em abril de 2002, de modo que todas as amostras analisadas nos anos anteriores foram apenas qualitativas. Até então, embora já houvesse sido estabelecido o percentual de 4% para a presença acidental de resíduos transgênicos em amostras embaladas comercializadas no país, não havia nenhum laboratório, tanto nacional ou internacional, público ou privado, que oferecesse tal serviço.

A partir de 2002, a AgroGenética passou a receber amostras para quantificação, e já neste ano a demanda pela análise quantitativa representou 45,92% do total de amostras analisadas. No ano seguinte, a demanda pela análise quantitativa superou o percentual de 50%, atingindo o valor de 57,15% do total de amostras analisadas. Justamente em 2003 estabeleceu-se o decréscimo no limite permitido para presença de resíduos transgênicos em alimentos de 4% para 1% do produto final. Em termos de rastreabilidade da cadeia produtiva, este decréscimo acarreta medidas mais efetivas para monitoramento dos níveis de resíduos GM que podem estar inerentes na composição dos produtos. Mesmo resíduos provenientes de contaminação cruzada se tornaram grandes riscos para contaminação de lotes não GM.

Em 2004, observou-se uma redução no percentual da demanda pela análise quantitativa para 38,63%, mas superior, em termos absolutos, aos anos anteriores, representando 520 amostras do total de 1347 analisadas no ano, comparadas com os valores de 335 e 429 analisadas nos anos 2002 e 2003, respectivamente.

TABELA 4 - Distribuição acumulada de amostras positivas com relação ao total de amostras analisadas dentro de cada classe durante o período de 2000 a 2005.

Produto	Total de Amostras Negativas	Total de Amostras Positivas	Total de Amostras da Classe	% (Classe / Total de Amostras Analisadas)	% (Positiva / Classe)
Amido de Milho	85	12	97	2,46	12,37
Bebidas Lácteas	34	4	38	0,96	10,53
Biscoitos	23	5	28	0,71	17,86
Condimentos e Temperos	92	45	137	3,47	32,85
Empanados	13	20	33	0,84	60,61
Farelo de Soja	187	149	336	8,52	44,35
Farinha de Trigo	109	30	139	3,52	21,58
Fubá de Milho	6	1	7	0,18	14,29
Lecitina	27	8	35	0,89	22,86
Matinais	127	14	141	3,58	9,93
Macarrão e Massas	13	18	31	0,79	58,06
Milho Grão	705	21	726	18,41	2,89
Mistura para Bolo	49	21	70	1,77	30,00
Mistura para Empanados	99	69	168	4,26	41,07
Óleos e Gorduras	36	12	48	1,22	25,00
Outros	249	23	272	6,90	8,46
Produtos Cárneos	57	81	138	3,50	58,70
Ração	159	70	229	5,81	30,57
Salsicha	51	136	187	4,74	72,73
Soja Grão	289	159	448	11,36	35,49
Sopas	21	0	21	0,53	0,00
Sucos Naturais	8	0	8	0,20	0,00
Produtos Protéicos de Soja	541	67	608	15,42	11,02
<b>TOTAL</b>	<b>2.980</b>	<b>965</b>	<b>3.944</b>		

Em 2005, o percentual de amostras analisadas quantitativamente foi de 49,53%, representando 246 do total de 497 amostras analisadas no ano.

O número total de amostras analisadas quantitativamente foi de 1530 do total de 3.325 amostras analisadas no período de 2002 a 2005. Outro fator que pode restringir a demanda pela análise quantitativa é o custo, que pode chegar a 30% a mais do valor da análise qualitativa.

A distribuição da demanda de análise quantitativa e qualitativa, no período de 2002 a 2005 está representada na Figura 4.

### **3.5. Avaliação das amostras quanto a presença de resíduos transgênicos acima do limite de 1%**

A partir de abril de 2003, o percentual permitido para a ocorrência de resíduos transgênicos em alimentos, para que não seja necessária a rotulagem do produto, é de 1% do produto final. Deste modo as análises de quantificação, principalmente as baseadas na técnica de PCR quantitativo, tem se revelado importantes ferramentas para auxílio em medidas de fiscalização e rastreabilidade da cadeia produtiva.

Durante o período de 2002 a 2005, 1530 amostras foram quantificadas, e destas, cerca de 626 (40,92%) apresentaram resíduos de DNA GM acima de 0,1% do total de DNA da espécie analisada.

Do total de 626 amostras, analisadas durante o período de 2002 a 2005, que apresentaram resultados positivos para a presença de DNA GM, cerca de 46,01% apresentou resíduos de transgênicos acima de 1,0% e 27,48% acima de 5,0%. Dentre os quatro anos em que as amostras foram analisadas, o ano de 2003 apresentou o maior percentual de amostras com resíduos GM superiores a 1,0%, superando 60% do total de amostras positivas quantificadas, enquanto 2005 apresentou o menor percentual, com cerca de 25% de amostras.

O ano de 2003 também se destacou com o maior percentual de amostras contendo resíduos de transgênicos acima de 5,0% do total de DNA da espécie analisada, atingindo o percentual de 39,78%. Em contrapartida, em 2005, amostras contendo resíduos de transgênicos acima de 5% foi de apenas 14,63%.

A distribuição das amostras quantitativas, positivas e negativas para a presença de resíduos de transgênicos, e ainda de acordo com os níveis percentuais da

presença de resíduos transgênicos, 1% e 5%, analisadas durante o período de 2002 a 2005, encontra-se na Tabela 5.

Embora tenham sido detectadas amostras contendo percentuais de DNA GM acima de 1% e 5% do total de DNA da espécie analisada, acima de 50% do total 626 amostras analisadas por PCR quantitativo apresentaram resíduos transgênicos com percentuais inferiores a 1%, logo não necessitariam ser rotulados. Com relação às amostras com níveis de DNA GM superiores a 1% e 5% do DNA total da espécie analisada, para se inferir sobre a necessidade de rotulagem, segundo os critérios legislativos nacionais, seria necessário verificar quanto da composição do produto é atribuída à espécie analisada. Isto ocorre pelo fato da legislação nacional sobre rotulagem se referir ao percentual de resíduo transgênico com relação ao produto final e a técnica de quantificação baseia-se apenas no DNA da espécie em questão.

Este tipo de legislação é apenas empregada no Brasil. Todos os demais países que adotaram níveis permitidos para a presença de resíduos transgênicos, o estabeleceram com base no percentual em que a matriz contribui para o produto final, e não considerando o produto final como um todo (MACKENZIE, 2000).

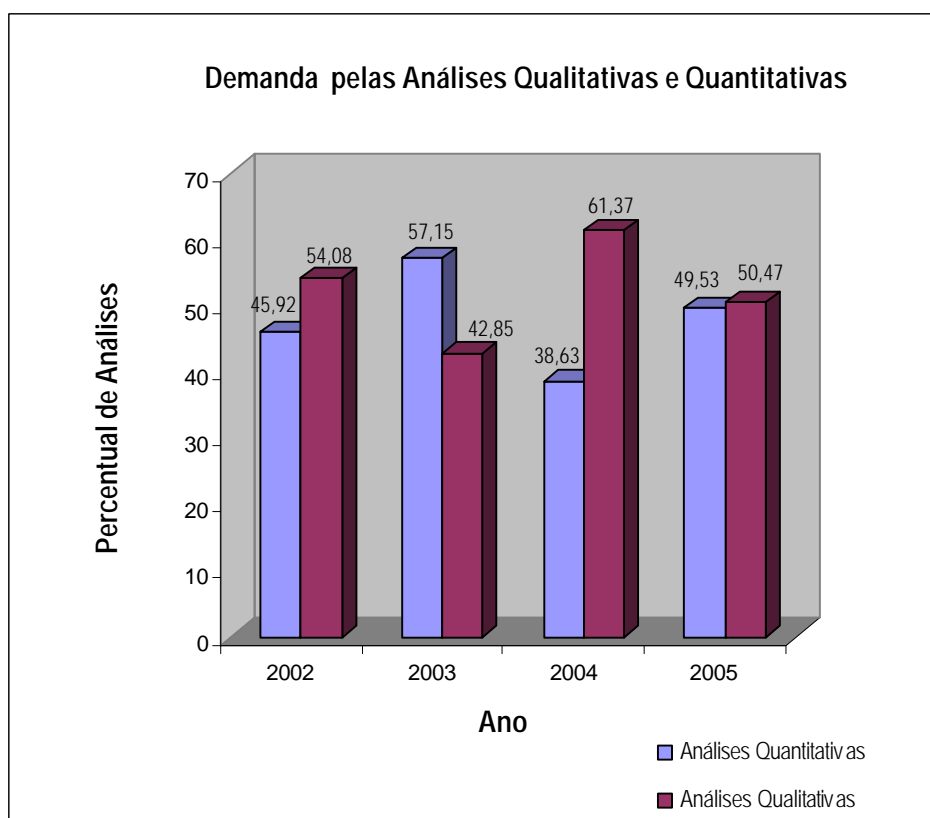


FIGURA 4 – Distribuição percentual da demanda de análise quantitativa e qualitativa com relação ao total de amostras analisadas durante o período de 2000 a 2005.

TABELA 5 - Distribuição das amostras positivas com relação aos níveis percentuais da presença de resíduos transgênicos no período de 2002 a 2005.

Ano	Amostras Negativas	Amostras Positivas	>1,0%	%	<1,0%	%	>5,0%	%
2002	220	115	51	44,35	64	55,65	28	24,35
2003	248	181	109	60,22	72	39,78	72	39,78
2004	313	207	97	46,86	110	53,14	54	26,09
2005	123	123	31	25,20	92	74,80	18	14,63
<b>Total</b>	<b>904</b>	<b>626</b>	<b>288</b>	<b>46,01</b>	<b>338</b>	<b>53,99</b>	<b>172</b>	<b>27,48</b>

#### 4. CONCLUSÕES

- Produtos contendo resíduos de transgênicos estão presentes em amostras de alimentos consumidas no Brasil, pelo menos, desde o ano 2000. Dentre estes, destacam-se a soja RR e o evento de milho Bt11.

- A presença de resíduos transgênicos foi detectada nos três diferentes grupos de produtos analisados, grãos, *in natura* e processados. Dentre as diferentes classes de produtos processados analisadas, considerando o nível de predominância da demanda pela análise, as classes de farelo de soja e soja grão foram as que mais se destacaram com relação ao percentual de amostras positivas por classe. Dentre os produtos processados, as classes de salsichas, empanados, produtos cárneos, mistura para empanados e condimentos foram as que apresentaram os maiores percentuais de resíduos transgênicos do total de amostras analisadas dentro da classe.

- A demanda de análise de resíduos transgênicos ocorreu, principalmente, para produtos *in natura* e grãos até o ano de 2003. A partir deste ano, a demanda se concentrou em amostras de produtos processados, que nos anos de 2004 e 2005 superou o percentual de 50% dos produtos analisados. Nestes anos também houve uma elevação do percentual de amostras provenientes do estado de São Paulo, sugerindo maior interesse por parte de empresas que utilizam matrizes potencialmente GM na composição de seus produtos a rastrearem sua cadeia produtiva. Tal comportamento parece ter sido influenciado principalmente pela preferência do mercado consumidor em amostras livres de transgênicos ao invés de medidas fiscais realizadas pelos Órgãos públicos. No entanto, a publicação do decreto de rotulagem em 2003, que determinou a exigência de rotulagem dos

produtos, com informações a cerca do tipo de evento transgênico e espécie doadora, caso o produto apresentasse resíduos de transgênicos acima de 1% do produto final, parece ter norteado ações efetivas de rastreabilidade da cadeia produtiva e certificação das matrizes constituintes dos produtos.

- De todas as classes de produtos analisadas durante os seis anos, excetuando-se as classes de sucos naturais e sopas, pelo menos uma amostra positiva para a presença de resíduos de transgênicos, foi detectada dentro de cada classe, em um determinado momento.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agbios Database. Disponível em <http://www.agbios.com/dbase>. Acesso em 26 de junho de 2006.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/pareceres>. Acesso em 27 de julho de 2006.

CONAB: Previsão e acompanhamento da safra 2004/2005. Abril/2005. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/safra/safra20042005.pdf> Acesso em 26 de junho de 2006.

HERNANDEZ, M.; RÍO, A.; ESTEVE, T.; PRAT S.; PLA, M. (2001). A Rapeseed-Specific Gene, Acetyl-CoA Carboxylase, Can Be Used as a Reference for Qualitative and Real-Time Quantitative PCR Detection of Transgenes from Mixed Food Samples. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3622-3627.

JAMES, C. (2006). Global status of commercialized transgenics crops: (2004). *ISAAA Briefs* N° 34, International Services for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY.

MACKENZIE, D. J. *Agriculture and Biotechnology Strategies (Canada) Inc.*, Comparison of International Regulatory Regimes for Food Products of Biotechnology. 2000. 62 pg.

MARCELINO, F. C. GUIMARAES, M. F. M.; PIMENTA, M. A. S.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. (2003). Detecção de resíduos de transgênicos em grãos e produtos derivados: a experiência da Universidade Federal de Viçosa. *Rev. Bras. Ciência e Biotec.* 31:15 - 22.

MEYER, R., CANDRIAN, U. ; LUÈ THY, J. (1994). Detection of Pork in Heated Meat products by Polymerase Chain Reaction (PCR). *JAOAC Int.* 77: 617-622.

- MONSANTO BIOTECHNOLOGY REGULATORY SCIENCES. (2004). A recommended procedure for real time quantitative TaqMan<sup>®</sup> PCR for Bollgard<sup>®</sup> cotton 531. 7 p.
- STUDER, E.; DAHINDEN, I.; LÜTHY, J.; HÜBNER, P. (1997). Detection of the genetically engineered 'maximizer' maize using the polymerase chain reaction (PCR). *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 88: 515–524
- PIMENTA, M. A. S. (2003). Detecção de transgênicos em soja e produtos derivados no Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa/MG. Brasil. 74p.
- ROGERS, S. O.; BENEDICH, A. J. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Man.* A6:1-10.
- ZIMMERMANN, A. LUTHY, J.; PAULI, U. (2000). Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 33: 210-216.

## Capítulo II

---

### **Detection and Quantification of Roundup Ready<sup>®</sup> soybean residues in sausage samples by conventional and Real-Time PCR**

Francismar Corrêa Marcelino<sup>a, b, c</sup>, Everaldo G. de Barros<sup>b, d</sup>, Marta F. M. Guimarães<sup>a, e</sup>

<sup>a</sup> AgroGenética, <sup>b</sup> Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, <sup>c</sup> Embrapa Trigo, <sup>d</sup> Department of General Biology, Federal University of Viçosa, <sup>e</sup> Embrapa Gado de Leite, Brazil

#### **Abstract**

The increasing presence of products derived from genetically modified (GM) plants in human and animal diets has led to the development of detection methods to distinguish biotechnology-derived foods from the conventional ones. The conventional and real-time PCR have been used, respectively, to detect and quantify GM residues in highly processed foods. DNA extraction is a critical step during the analysis process. Some factors such as DNA degradation, matrix effects, and presence of PCR inhibitors imply that a detection or quantification limit, established for a given method, is restricted to a matrix used during validation and cannot be projected to any other matrix outside the scope of the method. In Brazil, sausage samples were the main class of processed products in which Roundup Ready<sup>®</sup> (RR) soybean residues were detected. Thus, the validation of methodologies for detection and quantification of these residues is urgent. Sausage samples were submitted to two different methods of DNA extraction: modified Wizard and the CTAB method. The yield and quality were compared for both methods. DNA samples were analyzed by conventional and real-time PCR for detection and quantification of Roundup Ready<sup>®</sup> soybean in the samples. At least 200 ng of total sausage DNA was necessary for a reliable quantification. Reactions containing DNA amounts below this value led to large variations on the

expected GM percentage value. In conventional PCR the detection limit varied from 1.0 to 500 ng, depending on the GM soybean content in the sample. The precision, performance and linearity were relatively high, indicating that the method used for analysis was satisfactory.

*Keywords: Real-time PCR, GMO, Sausage*

## 1. Introduction

The cultivation of genetically modified (GM) plant species has dramatically increased within the last 10 years. The area planted with GM crops has increased from 1.7 million ha in 1996 to 90 million ha in 2005 (James, 2006). In Brazil, growers were first authorized to sell RR<sup>®</sup> soybean in 2003. In 2004 and 2005 both cultivation and commercialization of RR<sup>®</sup> soybean were authorized by the Brazilian government. As GM soybean cultivation increased in the country, the presence of GM residues in human and animal food proportionally rose. According to the Brazilian legislation the presence of GM residues exceeding the threshold limit of 1% needs to be informed on the food label.

A screening for the presence of transgenic residues, during the period from 2003 to 2005, in different processed products commercialized in the national market, revealed that sausages constitute the main product class in which these residues were detected (MARCELINO, 2006). From the analyses of about 200 sausage samples of different brands, randomly collected in the national market, over 70% were positive for the presence of residues of RR<sup>®</sup> soybean. Considering this high percentage, the present work proposes the validation of a methodology for detection and quantification of residues of RR<sup>®</sup> soybean in these samples.

RR<sup>®</sup> soybean residues in non-processed foods can be detected and quantified based on the presence of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase protein (EPSPS) by immunological methods (Duijn, Biert, Marcelis, Peppelman, & Hessing, 1999; Lipp, Anklam & Stave, 2000). Processed foods are usually analyzed with DNA-based procedures. The DNA-based methods make use of the polymerase chain reaction (PCR) technique and can be applied both to products *in natura* and to highly processed foods. However, some products offer many inconveniences for obtention of DNA extract with satisfactory amplificability (Vaitilingom, Pijnenburg, Gendre & Brignon, 1999; Lipp, Bluth, Eyquem, Kruse, Schimmel, Van den eed, & Anklam, 2001; Hübner, Studer & Lüthy, 1999; Vollenhofer, Burg, Schmidt, & Kroath, 1999; Cardarelli, Branquinho, Ferreira, Cruz & Gemal, 2005).

The analysis of processed foods presents some difficulties because of the several treatments that the original ingredients have to undergo during processing; besides, several ingredients may be present in the final product. Some ingredients,

such as proteins, polysaccharides, fat, salt, colorings, and others, may inhibit the PCR reaction (Terry, Harris & Parkes, 2002). Chemical and physical treatments may lead to extensive DNA fragmentation preventing its use as template in the PCR reaction (Meyer, 1999). These effects imply that a detection or quantification limit, established for a given method, is restricted to a matrix used during validation and cannot be projected to any other matrix outside the scope of the method (Lipp *et al.*, 2005).

Sausage samples undergo physical and chemical treatments during their production, as well as addition of different ingredients.

Sausages are an industrial meat product obtained by emulsification of meat from one or several animal species. Coloring may be added to the sausages and they may also undergo smoking and/or peeling. In Brazil, sausages can contain up to 7.5% (dry basis) or 22.5% (wet basis) of textured soybean protein. Moreover, other ingredients may be added to the sausage, such as animal fat or vegetable oil, salt, water, emulsifiers, colorings, sugars, aromatic substances, and seasonings. During its preparation the product undergoes cooking at 72°C for at least 0.5 hour.

The aim of the present work was the establishment of a methodology for detection and quantification of RR<sup>®</sup> soybean residues in samples of sausages commercialized in the national market, using the PCR technique.

The sausage samples were submitted to two different methods for DNA extraction, and the DNA was analyzed by conventional and real-time PCR for detection and quantification of Roundup Ready<sup>®</sup> soybean in the samples. The detection and quantification limits were established. The precision, performance and linearity were relatively high, indicating that the employed method of analysis was satisfactory.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Soybean food samples

Sausage samples of different brands and batches were randomly collected in the national market.

### 2.2. Soybean Reference samples

Certified reference material (CRM), i.e., soybean powder containing 0.1 to 5.0% Roundup Ready<sup>®</sup> soybean (Fluka), was used for qualitative and quantitative analyses. RR<sup>®</sup> soybean grains were also used as a control.

### 2.3. Genomic DNA Extraction

Duplicate samples of approximately 500 g of sausage were homogenized in an electric blender. The DNA extraction was tested by two different methodologies: modified Wizard and the CTAB method.

**Modified Wizard Method:** In the modified Wizard method, 1,290 µL extraction buffer [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 1% SDS], 150 µL 5M guanidine hydrochloride and proteinase K (20 mg/mL) were added to 500 mg of each sample and vortexed until a homogeneous mixture was obtained. The samples were incubated at 55°C for 12 h and centrifuged for 15 min at 6,000 g. About 500 µL of the supernatant was mixed with 1 mL of Wizard resin (Promega) and then applied to a Wizard mini column. The column was washed with 2 mL 80% ethanol and then centrifuged at 10,000 g for 2 min to eliminate residual ethanol. The nucleic acids were eluted with 50 µL of water at 70°C and stored at -20°C.

**CTAB Method:** In the CTAB method approximately 100 mg of homogenized sausage samples were mixed with 500 µL CTAB buffer [50 mM CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA] and incubated at 65°C for 20 min. The samples were deproteinized with 520 µL chloroform: isoamyl alcohol (24:1), vortexed and centrifuged for 10 min at 10,000 g. The supernatant was transferred to a new 1.5-mL eppendorf tube, the nucleic acids were precipitated with 1 volume of isopropanol and 0.5 volume of 7.5 M ammonium acetate and centrifuged for 10 min at 10,000 g. The supernatant was discarded and the pellet washed once with 500 µL 70% ethanol.

The pellet was dried at room temperature for approximately 10 min, resuspended in 50  $\mu$ L water and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

#### *2.4. Yield and quality of nucleic acid extracts*

The nucleic acid concentration in the extracts was estimated by spectrophotometry at  $A_{260\text{nm}}$  using the Gene Quant Pro spectrophotometer (Amersham). One absorbance unit at 260 nm was considered to correspond to 50 ng of nucleic acid per  $\mu$ L of solution. Sample purity was estimated by the  $A_{260}/A_{280}$  ratio.

The extracts were further analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gels containing 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide. The presence of inhibitors in the PCR reactions was determined by amplifying a portion of the soybean lectin gene used as an endogenous reference (Meyer, Chardonnens, Hubner & Luthy, 1996; Duijn, Biert, Marcelis, Peppelman, & Hessing, 1999).

#### *2.5. Quantitative PCR analysis of transgenic sequences*

Real time PCR analyses were carried out in an SDS 7000 equipment (Applied Biosystems). Samples were amplified with the aid of the *TaqMan* GMO Soy 35S Detection Kit (Applied Biosystems). This kit is especially designed for the simultaneous amplification of the 35S promoter and the soybean lectin gene targets. The kit contains *AmpliTaq* Gold polymerase and a master mix including  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs, uracyl *N*-glycosylase (UNG), the passive reference dye ROX, and primers and probes for both target sequences. The 35S probe is labeled with FAM at the 5' end while lectin probe is labeled with VIC. Reactions were carried out in 96-well microtiter plates in a total volume of 25  $\mu$ L, containing 22  $\mu$ L master mix, 0.5  $\mu$ L *AmpliTaq* Gold, and 2.5  $\mu$ L DNA extract (500 ng). For each plate, a no-template control, a negative control and the 0.1 to 5.0% CRMs were analyzed together. After the initial steps at  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min (UNG activity) and at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min (activation of the *AmpliTaq* Gold polymerase), a two-step program of  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min was conducted for 40 cycles. Details about primer and probe sequences, amplicon sizes, and concentrations of reaction components are not provided by the manufacturer in the kit.

The percentage of GM soybean in the sausage samples was determined by the delta Ct relative quantification method. The difference between the Ct values for the transgenic target and the endogenous reference was plotted as a logarithm function of the GM percentage. Samples with Ct values 40 or above were considered negative for

the target sequence. Each sample was extracted in duplicate in three different extractions, and amplified in three independent runs. Precision was estimated by the standard deviation value (SDV) and relative standard deviation (% RSD).

### *2.6. Qualitative PCR analysis of transgenic sequences*

After quantification, the sausage samples were also amplified by conventional PCR with specific primers that flanked portions of the following target regions: 35S promoter (GenBank Accession AJ308514), NOS terminator (GenBank Accession 308515), and coding region of the EPSPS gene (GenBank Accession AB180963). In order to test if the DNA samples could be amplified, preliminary amplification reactions with the lectin gene primers were conducted. The primer sequences and the sizes of the expected fragments are listed in Table 1.

Amplification reactions were performed in a thermocycler model 7900 (Applied Biosystems), in a final volume of 25  $\mu$ L containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 or 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM of each dNTP, 1 U of *Taq* DNA polymerase, 0.2 pmoles of each primer, and 0.01 ng to 1,000 ng of template DNA. Amplification conditions for the lectin gene were 95°C for 4 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 40 s. An additional extension step at 72 °C for 3 min was performed after the last cycle. Amplification conditions for the 35S promoter and the EPSPS regions were essentially the same as those used for the lectin gene, except that the number of cycles was raised to 40 and the annealing temperature for the 35S promoter region was 62°C. To amplify the NOS terminator region a “touchdown” program was used: one step at 95 °C for 4 min, one cycle at 95°C for 20 s, 68°C for 40 s and 72°C for 1 min followed by nine cycles in which the annealing temperature was decreased by 1°C at each cycle. When the annealing temperature reached 58°C, 20 additional cycles were conducted. An additional extension step at 72°C for 3 min was performed after the last cycle.

### *2.7. Sensitivity of qualitative and quantitative PCR*

DNA extracted by the two methods used (modified Wizard and CTAB) was diluted and tested in the following amounts in the PCR reactions: 1,000, 500, 200, 100, 10, 0.1 and 0.01 ng. Each dilution was tested in duplicate in three independent amplification reactions. The LOD (limit of detection) was defined as the minimum

amount of DNA in the reaction that led to the amplification of the fragment with the expected size in an agarose gel in all repetitions.

Quantitative multiplex reactions with primers for the 35S promoter region and the endogenous lectin gene labeled with different fluorescent dyes were also performed to establish the sensitivity for the quantification of RR<sup>®</sup> soybean present in the sausage samples. The conversion of mass to genome copy number was based on the haploid genome mass (1C value) for *Glycine max*, which is 1.25 pg, obtained from the Plant DNA C-values Database (Bennett & Leitch, 2003).

In addition to the amount tested for LOD determination, the amounts of 2,000 and 5,000 ng were also used. Based on the average Ct values obtained for each DNA amount, the quantification sensitivity, the linearity, and the coefficient of correlation were estimated.

TABLE 1 - Sequences of primers used in the qualitative PCR. The respective size of the PCR products is given in base pairs.

Primers	Target	Sequence	Amplicon size
Lec-F	Lectin gene	5´GCCCTCTACTCCACCCCATCC 3´	118 bp
Lec-R		5´GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG 3´	
Nos-Long F	NOS terminator	5´ATTGCGGGACTCTAATCATAAAAA 3´	180 bp
Nos Long-R		5´ATCGTTCAAACATTTGGCAATAA 3´	
RR-F	Region of the EPSPS gene	5´TGATGTGATATCTCCACTGACG 3´	172 bp
RR-R		5´TGTATCCCTTGAGCCATGTTGT 3´	
35-S	35S promoter	5´GATAGTGGGATTGTGCGTCA 3´	195 bp
35-R		5´GCTCCTACAAATGCCATCATTGCG 3´	

### 3. Results and Discussion

DNA extraction from sausage samples was tested with two different methods, the CTAB and the modified Wizard. Both methods yielded DNA with good quality; however, the samples obtained with the modified Wizard method were less degraded and presented fragments larger than 500 bp (FIGURE 1). For PCR detection and quantification of GMO in foodstuffs the recommended amplicon size lies within the range of 70 to 200 bp. The reduced size of DNA molecules extracted from a

processed matrix is of concern if a considerable portion of the fragments cannot function as PCR templates because their insufficient size does not span the entire target sequence (Lipp *et al.*, 2005).

The ratio  $A_{260}/A_{280}$ , a measure of DNA purity, indicated that samples extracted by the Wizard method presented a lower degree of contaminants. The average  $A_{260}/A_{280}$  ratio value for the samples extracted by the Wizard method was 1.70, whereas for the samples extracted by the CTAB method the average ratio was 1.48. The average DNA yields were 31.5  $\mu\text{g}$  (Wizard) and 75  $\mu\text{g}$  (CTAB), most probably because in the latter case there were more  $A_{260}$  absorbing contaminants than in the samples obtained by the Wizard method.

The presence of inhibitors during the PCR reactions was tested by amplification of a specific region of the endogenous soybean lectin gene. Amplification was done with at least 100 ng of sausage DNA samples obtained by both extraction methods. As for DNA extracted from soybean grains, amplification products were visualized when at least 0.1 ng of target DNA was added to the reaction mix (FIGURE 2). This corresponds to approximately 80 copies of the soybean genome.

### *3.2. Quantitative PCR*

The percentage of GM soybean in the sausage samples was determined by the relative quantification delta Ct method. The calibration curve was established with certified reference materials (Fluka) containing 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0% RR<sup>®</sup> soybean. The obtained correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.9957, which is above the minimum acceptable value of 0.98. The delta Ct values obtained varied from 12.96 for the negative control to 4.54 for the 5% reference sample. The characteristics of the delta Ct curves are summarized in Table 2 and Figure 3.

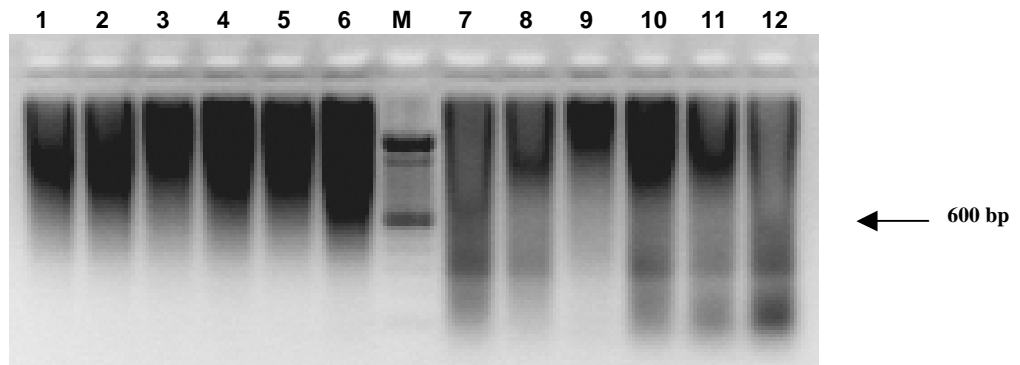


FIGURE 1 – Electrophoretic profile of sausage DNA samples extracted by the modified Wizard (lanes 1 to 6) and the CTAB (lanes 7 to 12) methods. M: 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

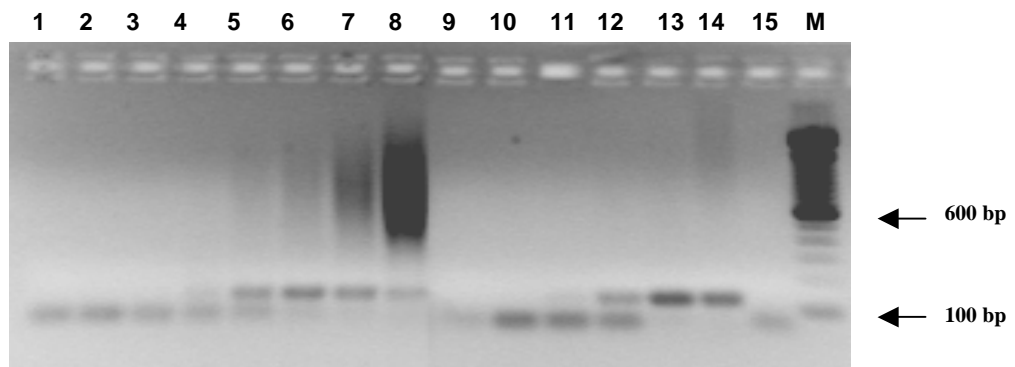


FIGURE 2 – Electrophoretic analysis of the quality of sausage DNA samples. Total DNA was amplified with specific primers for the soybean lectin gene (118 bp). Different amounts of sausage DNA were tested in the amplification reactions: 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100, 200, 500 and 1,000 ng (lanes 1 through 8, respectively). Lanes 10 through 14 were loaded with soybean grain DNA: 0.01, 0.1, 1.0, 10, and 100 ng, respectively. Lanes 9 and 15: no DNA. Lane M: 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

TABLE 2 – Valores de Ct e delta Ct para os alvos transgênico e referência endógena, obtidos a partir da amplificação dos padrões de referência certificados, por PCR quantitativo.

CRM's	Ct 35S	Ct Lectina	delta Ct <sup>a</sup>	Mean delta Ct	delta Ct SDV <sup>b</sup>
Standard 0.0 %	40.00	27.00	13.00	12.96	0.05
Standard 0.0 %	39.47	26.54	12.93		
Standard 0.1 %	37.68	26.91	10.78	10.32	0.65
Standard 0.1 %	37.10	27.24	9.86		
Standard 0.5 %	34.47	27.19	7.28	7.61	0.47
Standard 0.5 %	35.48	27.55	7.94		
Standard 1.0 %	32.95	26.34	6.62	6.91	0.42
Standard 1.0 %	33.83	26.62	7.21		
Standard 2.0 %	32.53	26.62	5.91	5.81	0.15
Standard 2.0 %	32.67	26.96	5.71		
Standard 5.0 %	31.19	26.80	4.39	4.54	0.22
Standard 5.0 %	31.20	26.50	4.69		

<sup>a</sup> Ct, Cycle threshold

<sup>b</sup> SDV, Standard deviation value.

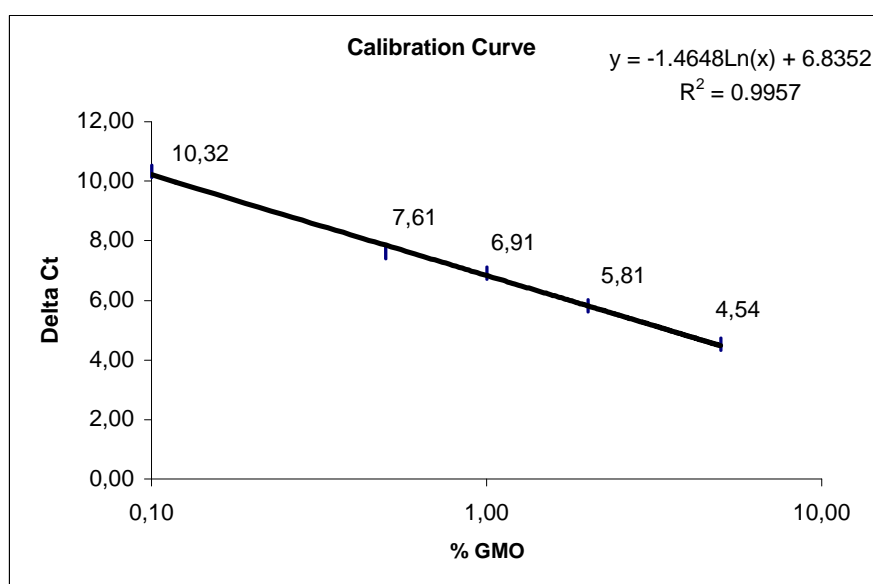


FIGURE 3 - The delta Ct calibration curve obtained with certified reference materials (Fluka) containing 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0% RR<sup>®</sup> soybean. The difference between the Ct values for the transgenic target and the endogenous reference was plotted as a function of logarithm of the GM percentage. The coefficient of correlation obtained ( $R^2$ ) was 0.9957, above the minimum acceptable value of 0.98.

Table 3 shows the quantitative data for the sausage samples. For the delta Ct method, unknown percentages of GMO are directly derived from the determined delta Ct values. Mean relative values of GMO % for the three analyzed samples were 39.84, 24.28 and 0.62. The mean values of the RSD % for the samples which presented more than 5% RR<sup>®</sup> soybean were all below 10% both within and among the runs, except in the third replicate of the second run. However, for the sample with the lowest GMO content, close to 0.5%, the RSD % values were higher. The highest value (42.79%) was obtained for the repetition in the third run. The mean RSD % value was 33.07%. Although the RSD % values for the sample with low GMO content was relatively high, the precision of the experiment is still considered acceptable. For methods of GMO analysis, the precision and trueness of the quantitative estimates are acceptable if values for RSD % and error are not higher than 20% (Taverniers, Bockstale & Loose, 2004; Taverniers, Windels, Bockstaele & Loose, 2001). Values varying from 20 to 35% for intra-lab imprecision and bias in quantitative real-time PCR data have also been reported in other studies, especially if concentrations at the 0.1% level are considered (Dahinden, Zimmermann, Liniger, & Pauli, 2002; Pardigol, Guillet, & Pöpping, 2003). In all runs the SDV was very low, indicating high accuracy of the results.

To test the sensitivity of the quantification method, total DNA of the sausage samples containing 24.28% and 0.62% RR<sup>®</sup> soybean was diluted and different amounts of DNA (0.01 to 5,000 ng) were used in multiplex reactions in which the targets were the 35S promoter region and the lectin gene. At least 100 ng of total sausage DNA was necessary for a reliable quantification of the sample containing more than 5.0% of RR<sup>®</sup> soybean. When the amount of DNA was decreased to 100 ng or less, the Ct value would slightly deviate from the calculated standard curve, which indicated that the quantification was not accurate. Mean GMO % value of 24.44 was obtained for dilutions containing 100 to 5,000 ng total sausage DNA, with an SDV 4.56 and a CV % of 18.66. This value differs only by 0.16% in relation to the originally determined value (24.28%). However, for the sample containing 0.62% RR<sup>®</sup> soybean at least 200 ng of total sausage DNA were necessary for a reliable quantification of the sample. When only 100 ng of total sausage sample were used, the RSD % and SDV values were higher (0.44 and 45.44%, respectively), in contrast with the values of 0.18 and 22.23% when 200 ng were added (Table 4). This sensitivity is well above the experimentally determined LOQ (30 copies of the

TABLE 3 – Percentage estimate of RR<sup>®</sup> soybean in sausage samples. Positive samples for the presence of GM soybean were quantified by real-time PCR using the delta Ct method. Each sample was amplified in duplicate in three independent PCR runs.

Runs	Sample Name	delta Ct <sup>a</sup>	%GMO	%GMO Mean per run	SDV per run <sup>b</sup>	% RSD per run <sup>c</sup>	%GMO Mean	SDV Mean	Mean % RSD
1	Sample 1.1	1.37	41.01	41.56	0.78	1.88	39.8415	6.9963	6.2770
	Sample 1.2	1.33	42.11						
2	Sample 1.3	1.83	29.96	31.71	2.48	7.83			
	Sample 1.4	1.67	33.47						
3	Sample 1.5	1.10	49.23	46.25	4.22	9.12			
	Sample 1.6	1.29	43.27						
1	Sample 2.1	1.93	28.02	27.81	0.29	1.04	24.2801	4.0593	8.8711
	Sample 2.2	1.95	27.61						
2	Sample 2.3	2.46	19.53	20.33	1.12	5.53			
	Sample 2.4	2.35	21.12						
3	Sample 2.5	1.92	28.20	24.70	4.95	20.05			
	Sample 2.6	2.34	21.20						
1	Sample 3.1	6.93	0.94	0.80	0.19	24.29	0.6282	0.2432	33.0750
	Sample 3.2	7.44	0.66						
2	Sample 3.3	8.52	0.32	0.41	0.13	32.14			
	Sample 3.4	7.84	0.50						
3	Sample 3.5	7.02	0.88	0.68	0.29	42.79			
	Sample 3.6	7.94	0.47						

<sup>a</sup> Ct, Cycle threshold

<sup>b</sup> SDV, Standard deviation value.

<sup>c</sup> RSD, relative standard deviation.

TABLE 4 – Sensitivity of RR<sup>®</sup> soybean quantification in sausage samples containing close to 0.5% and more 5.0% of RR<sup>®</sup>

Sample Name	DNA Amount	Ct 35S <sup>a</sup>	Ct Lec	delta Ct	%GMO	%GMO Mean	SVD <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup>
Sample containing close to 0.5% of RR <sup>®</sup> soybean	5000 ng	33,23	25,68	7,55	0,61	0,80	0,18	22,23
	2000 ng	34,16	26,91	7,25	0,76	0,97 *	0,44 *	45,44 *
	1000 ng	36,08	28,66	7,42	0,67			
	500 ng	37,11	30,29	6,82	1,01			
	200 ng	38,68	31,82	6,87	0,98			
	<b>100 ng</b>	<b>38,96</b>	<b>33,01</b>	<b>5,96</b>	<b>1,81</b>			
	<b>10 ng</b>	<b>39,44</b>	<b>34,75</b>	<b>4,69</b>	<b>4,29</b>			
	<b>1.0 ng</b>	<b>38,93</b>	<b>38,59</b>	<b>0,34</b>	<b>82,40</b>			
	<b>0.1 ng</b>	<b>40,00</b>	<b>40,00</b>	<b>0,00</b>	<b>103,97</b>			
	<b>0.01 ng</b>	<b>40,00</b>	<b>40,00</b>	<b>0,00</b>	<b>103,97</b>			
Sample containing more than 5.0% of RR <sup>®</sup> soybean	5000 ng	27.33	25.47	1.87	29,25	24,44	4,56	18,66
	2000 ng	29.07	26.68	2.39	20,49			
	1000 ng	29.20	27.13	2.06	25,55			
	500 ng	30.14	28.31	1.82	30,15			
	200 ng	31.15	28.70	2.45	19,64			
	100 ng	31.60	29.28	2.31	21,56			
	<b>10 ng</b>	<b>36.46</b>	<b>33.33</b>	<b>3.12</b>	<b>12,47</b>			
	<b>1.0 ng</b>	<b>38.98</b>	<b>35.31</b>	<b>2.67</b>	<b>16,93</b>			
	<b>0.1 ng</b>	<b>38.86</b>	<b>36.19</b>	<b>6.67</b>	<b>1,12</b>			
	<b>0.01 ng</b>	<b>39.28</b>	<b>38.06</b>	<b>1.22</b>	<b>45,50</b>			

<sup>a</sup> Ct, Cycle threshold.

<sup>b</sup> SDV, Standard deviation value.

<sup>c</sup> RSD, relative standard deviation.

\* Values obtained when 100 ng of DNA was tested.

target) for a pure (100%) soy product (Berdal & Holst-jensen, 2001). However, this limit is only applicable if DNA is of sufficient purity and quality. DNA samples extracted from a typical food matrix will usually be of lower purity than the DNA typically used for validating PCR methods, such as plasmid DNA or DNA extracted from raw or low-processed materials. Thus, the relative detection and quantification limits are functions of the DNA template. For real food analysis it is necessary to define the functional limits to be used. In addition to the low copy number, the harsh conditions during processing of the samples lead to fragmented DNA. It is known that measurement uncertainty generally increases with a decrease on the number of target copies or GMO content (Pardigol, Guillet & Pöpping, 2003). In conclusion, the quantification of RR<sup>®</sup> soybean in sausage samples was highly precise if the starting amount of total sausage DNA was at least 100 ng for samples containing more than 5.0% and at least 200 ng for samples containing close to 0.5% of RR soybean. The delta Ct values for the different dilutions are presented in Table 4.

To test the linearity of the method, Ct-values were plotted against the logarithm of DNA concentration (Figure 4). Both PCR systems, for lectin and 35S promoter region, were linear within the dynamic working range defined by the Ct-values for the highest and lowest target concentrations, as indicated by the correlation coefficient value which was greater than 0.98. A linear relationship with a slope of -2.406 and -2.066 for lectin and 35S promoter region, respectively, were obtained between the Ct value and the starting DNA quantity.

### *3.3. Qualitative PCR*

The sausage samples previously quantified were analyzed by conventional PCR. The DNA extracted by both methods was amplified with specific primers for the 35S promoter region, the NOS terminator and the coding region of the EPSPS gene (FIGURES 5, 6 and 7, respectively). The target regions were detected in the different samples tested; however, the detection sensitivity varied according to the percentage of GM soybean in the samples. LOD values for the EPSPS gene fragment, the 35S promoter region and the NOS terminator were 1.0 ng, 100 ng and 100 ng, respectively, for samples with a GM soybean content higher than 5%. Nonetheless, for samples with GM soybean content close to 0.5%, the LOD values increased to 10, 500, and 500 ng, respectively. In all reactions, non-GM soybean samples were used as negative controls. In addition, the intensity of the obtained DNA bands was

compared with those of standard references containing 0.5 and 1.0% of RR<sup>®</sup> soybean and of DNA extracted from soybean grains which were 100% GM

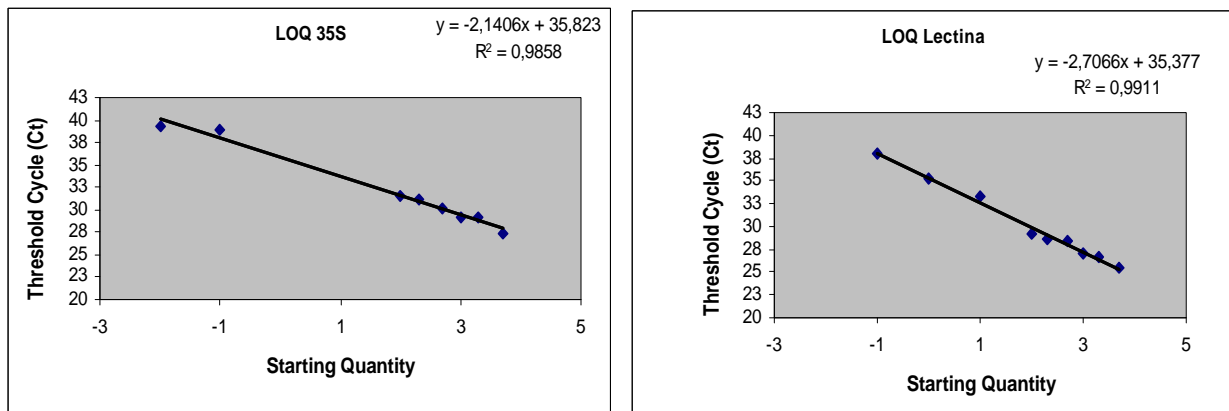


FIGURE 4 – Linearity test of the quantification of RR<sup>®</sup> soy em sausages samples. Diferents amounts of DNA (0.01 to 5.000 ng) were used in multiplex reactions in which the targets were the 35S promoter region and the lectin gene. The Ct-values were plotted against the logarithm of DNA concentration. The amplication for lectin and 35S promoter region were linear within the dynamic working as indicated by the correlation coefficient value which was greater than 0.98.

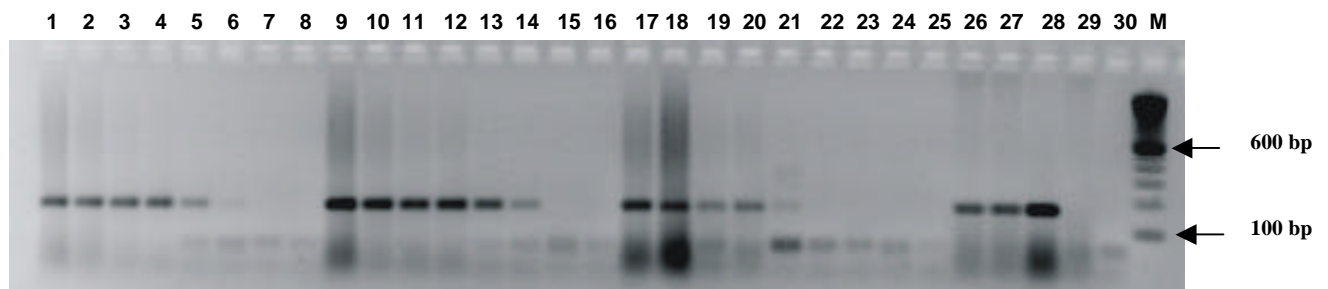


FIGURE 5 – Electrophoretic analysis of qualitative PCR products of GM soybean in sausage samples. The DNA was amplified with specific primers for the EPSPS coding region (172 bp) which is present in RR<sup>®</sup> soybean. DNA from sausage samples containing more than 5% (lanes 1 to 16) or close to 0.5% (lanes 17 to 25) RR<sup>®</sup> soybean. Total sausage DNA: 1,000 ng (lanes 1, 9, and 17), 500 ng (lanes 2, 10 and 18), 200 ng (lanes 3, 11 and 19), 100 ng (lanes 4, 12, and 20), 10 ng (lanes 5, 13, and 21), 1 ng (lanes 6, 14 and 22), 0.1 ng (lanes 7, 15, and 23), 0.01 ng (lanes 8, 16, and 24). Lanes 25 (no DNA), 26 (CRM 0.5%), 27 (CRM 1.0%), 28 (DNA from 100% GM soybean grains), 29 (DNA from non-GM soybean grains), 30 (no DNA), M: 100 bp size marker (Invitrogen).

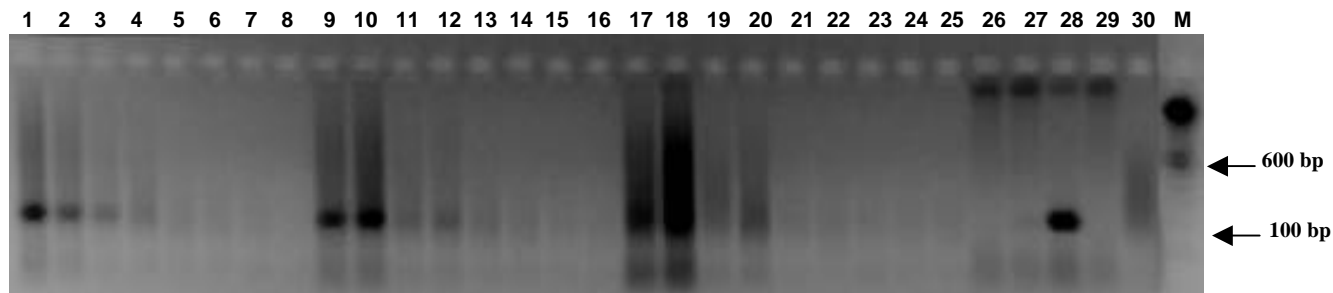


FIGURE 6 – Electrophoretic analysis of qualitative PCR products of GM soybean in sausage samples. The DNA was amplified with specific primers for 35S promoter region (195 bp) which is present in RR<sup>®</sup> soybean. DNA from sausage samples containing more than 5% (lanes 1 to 16) or close to 0.5% (lanes 17 to 25) RR<sup>®</sup> soybean. Total sausage DNA: 1,000 ng (lanes 1, 9, and 17), 500 ng (lanes 2, 10 and 18), 200 ng (lanes 3, 11 and 19), 100 ng (lanes 4, 12, and 20), 10 ng (lanes 5, 13, and 21), 1 ng (lanes 6, 14 and 22), 0.1 ng (lanes 7, 15, and 23), 0.01 ng (lanes 8, 16, and 24). Lanes 25 (no DNA), 26 (CRM 0.5%), 27 (CRM 1.0%), 28 (DNA from 100% GM soybean grains), 29 (DNA from non-GM soybean grains), 30 (no DNA), M: 100 bp size marker (Invitrogen).

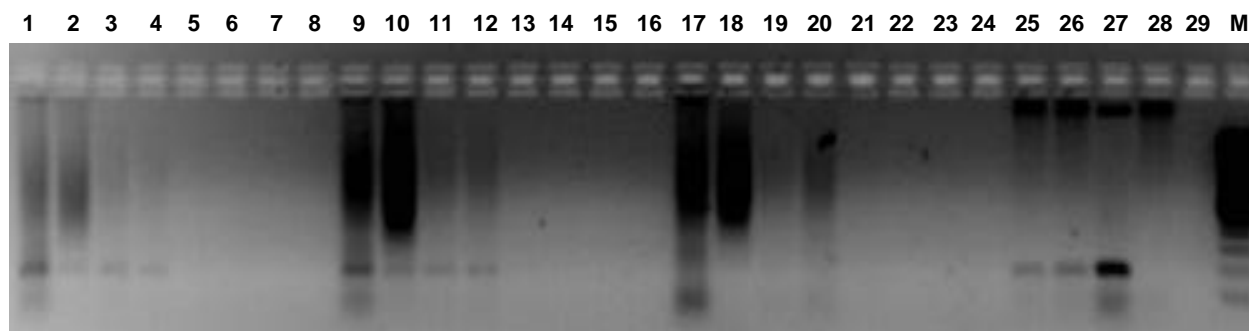


FIGURE 7 – Electrophoretic analysis of qualitative PCR products of GM soybean in sausage samples. The DNA was amplified with specific primers for the NOS terminator (180 bp) which is present in RR<sup>®</sup> soybean. DNA from sausage samples containing more than 5% (lanes 1 to 16) or close to 0.5% (lanes 17 to 25) RR<sup>®</sup> soybean. Total sausage DNA: 1,000 ng (lanes 1, 9, and 17), 500 ng (lanes 2, 10 and 18), 200 ng (lanes 3, 11 and 19), 100 ng (lanes 4, 12, and 20), 10 ng (lanes 5, 13, and 21), 1 ng (lanes 6, 14 and 22), 0.1 ng (lanes 7, 15, and 23), 0.01 ng (lanes 8, 16, and 24). Lanes 25 (CRM 0.5%), 26 (CRM 1.0%), 27 (DNA from 100% GM soybean grains), 28 (DNA from non-GM soybean grains), 29 (no DNA), M: 100 bp size marker (Invitrogen).

#### **4. Conclusions**

RR<sup>®</sup> soybean present in sausage samples could be detected and quantified by PCR using DNA samples extracted with the modified Wizard and the CTAB methods. Previous studies have reported difficulties in extracting amplifiable DNA from many foods; however, by using samples of at least 100 mg of homogenized sausage, both methods yielded enough DNA for analysis. The DNA obtained by both methods presented good quality and samples with GMO content close to 0.5% could be detected and quantified with precision.

Usually a large amount of DNA (100-500 ng) is needed for detection and quantification of GMO in foodstuffs. Nevertheless, for sausage samples low quantities of RR<sup>®</sup> soybean could be detected and quantified in relatively small amounts of total DNA: 1.0 ng for the EPSPS target in the qualitative analysis and 200 ng for the 35S promoter region in the quantitative analysis.

#### **5. Acknowledgment**

The authors would like to thank Federal University of Viçosa and the Genetic Analyses Laboratory – AgroGenética.

## 6. References

- Bennett, M. D. & Leitch, I. J. (2003). Plant DNA C-Values Database, Royal Botanic Gardens: Kew, UK., <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>.
- Berdal, K., Holst-jensen, A. (2001). A Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *Eur. Food Res. Technol.*, 213, 432-438.
- Cardarelli, P. Branquinho, M. R., Ferreira, R. T. B., Cruz, F. P., Gemal, A. (2005). Detection of GMO in food products em Brazil: the INCQS experience. *Food Control*, 16, 859-866.
- Dahinden, I., Zimmermann, A., Liniger, M. & Pauli, U. (2002) Processing. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill F (eds) Rapid cycle real-time PCR – methods and applications, microbiology and food analysis (pp 251-258). Berlin: Springer.
- Duijn, G. V., Biert, R. V., Marcelis, H. B., Peppelman, H. & Hessing, M. (1999). Detection methods for genetically modified crops. *Food Control*, 10, 375–378.
- Hübner, P., Studer, E. & Lüthy, J. (1999). Quantification of genetically modified organisms in food. *Nat. Biotechnol.*, 17, 1137-1138.
- James, C. (2006). Global status of commercialized transgenics crops: 2005. *ISAAA Briefs* N° 34, International Services for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY.
- Lipp, M., Anklam, E. & STAVE, J. (2000). Validation of an immunoassay for detection and quantification of genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: Inter-laboratory study. *J. AOAC Int.*, 83, 919-927.

- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van Den Eed, G. & Anklam, E. (2001). Validation of method based on polymerase chain reaction for a for detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur. Food Res. Technol.*, 212, 497-504.
- Lipp, M., Shillito, R., Giroux, R., Spiegelhalter, F., Charlton, S. & Pinero, S. (2001). Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *J. AOAC Int.* 88,136-154.
- Meyer, R., Chardonens, F., Hubner, P. & Luthy, J. (1996). Polymerase Chain Reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z. Lebensm Unters Forsch. A.*, 203, 339–344.
- Meyer, R. (1999). Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*, 10, 391-399.
- Pardigol, A., Guillet, S. & Pöpping, B. (2003). A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. *Eur Food Res Technol*, 216, 412-420.
- Taverniers, I., Windels, P., Bockstaele, E. & De Loose, M. (2001). Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. *Eur. Food Res. Technol.*, 213:417-424.
- Taverniers, I., Bockstaele, E. & De Loose, M. (2004). Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1198-1207.
- Terry, C. F., Harris, N. & Parkes, H. (2002). Detection of Genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *Journal of AOAC Int.*, 85, 768-774.
- Vaitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F. & Brignon, P. (1999). Real time of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 5261-5266.

Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J. & Kroath, H. (1999). Genetically modified organism in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 5038–5043.

## Capítulo III

---

### **Construção de padrões de calibração baseados em número de cópias de plasmídios recombinantes para a quantificação de OGMs em alimentos pela técnica de PCR quantitativo**

#### **RESUMO**

A determinação do percentual de resíduos transgênicos (%OGM) pela técnica de PCR quantitativo requer o emprego de padrões de calibração apropriados. Estes são utilizados para a construção de curvas de calibração para a quantificação relativa do número de moléculas de DNA geneticamente modificado (GM). Amostras calibradoras comerciais, conhecidas como materiais de referência certificados (CRMs) são as mais utilizadas. No entanto, devido a algumas características intrínsecas, estes padrões apresentam problemas na reprodutibilidade, principalmente atribuídos à extrapolação dos percentuais de OGM estimados em massa para número de moléculas de DNA. Além disso, estão disponíveis apenas na faixa de concentração variando de 0,1 a 5,0%, apresentam alto custo e não atendem a demanda dos vários tipos e eventos GM comercializados. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de padrões de calibração alternativos, baseados no número de cópias de plasmídios recombinantes. Dois fragmentos de DNA, contendo partes da região promotora 35S e do gene lectina da soja, foram clonados e os plasmídios foram utilizados para a construção de curvas de calibração para a quantificação relativa pelos métodos da curva padrão e do delta Ct. Ambas as curvas mostraram eficiência de amplificação dos diferentes alvos, coeficiente de correlação, índice de inclinação da reta e y-intercepto satisfatórios quando comparadas com curvas baseadas em DNA genômico (gDNA), construídas a partir do DNA dos CRMs. Os desvios com relação à repetibilidade dos valores de Ct ou delta Ct obtidos nas diferentes repetições, também foram inferiores a limites aceitáveis estabelecidos para a quantificação de %OGM. As curvas construídas com DNA plasmidial (pDNA) foram capazes de quantificar com precisão as amostras

CRMs. No entanto, o método do delta Ct apresentou os valores mais expressivos de estabilidade e consistência dos resultados. A acuracidade das curvas foi avaliada pela quantificação de amostras de alimentos. Além das curvas baseadas em pDNA, curvas construídas com os CRMs foram utilizadas para a quantificação das amostras. A %OGM das amostras de alimentos não apresentou variação significativa entre as diferentes curvas utilizadas, concluindo-se que as curvas pDNA são tão precisas quanto as baseadas em gDNA para a quantificação de resíduos transgênicos em alimentos. Mesmo quando amostras que apresentavam baixos níveis de contaminação de resíduos transgênicos foram analisadas, os valores estimados da %OGM foram estáveis nas diferentes repetições. No entanto, os valores estimados de %OGM para a maioria das amostras analisadas, apresentaram maiores similaridades quando foi empregado o mesmo método de quantificação, o delta Ct. Os desvios obtidos com relação aos resultados de quantificação foram maiores dentro das repetições de cada curva do que entre as curvas pDNA e gDNA, quando o método do delta Ct foi utilizado.

## 1. INTRODUÇÃO

A técnica de PCR quantitativo vem sendo a metodologia comumente empregada para quantificação de resíduos transgênicos em alimentos. Em contraste com quantificações chamadas de “*end point*”, a quantificação em tempo real é baseada na intensidade de fluorescência emitida nos ciclos iniciais da PCR, durante a fase logarítmica, quando dois alvos são co-amplificados, o transgene e um gene endógeno. A fluorescência é originada durante a hibridização do DNA com sondas ou *primers* específicos, marcados com fluoróforos. A intensidade de sinal emitida é proporcional à quantidade de DNA amplificada de cada alvo e aumenta exponencialmente a cada ciclo de amplificação. Quando a intensidade de fluorescência emitida ultrapassa um valor específico, a quantidade de ciclos necessários para tal é definida como Ct (Cycle treshold). O valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de DNA alvo presente nas amostras.

O percentual de DNA GM presente nas amostras é determinado pela quantificação relativa, que pode ser realizada pelo método da curva padrão ou do delta Ct (Ct do alvo transgene menos o Ct da referência endógena). No primeiro caso, a curva de calibração é contruída plotando-se o número de cópias ou concentração de amostras padrões em função dos valores de Ct, para ambos os alvos, endógeno e transgênico. O número de cópias ou massa dos alvos são derivados da amplificação de parte do cassete transgene e de um gene endógeno, espécie específico. O percentual de OGM das amostras é obtido pela divisão do número de cópias ou massa do alvo transgênico pelo número de cópias ou massa

da referência engógena, e multiplicado por 100. Neste caso, o percentual relativo de OGM é derivado de duas quantificações absolutas, uma para cada alvo (HOLST-JENSEN *et al.*, 2003).

Pela segunda estratégia, a construção das curvas de calibração utiliza padrões com percentuais de OGM definidos, obtidos pela mistura de ambos os alvos, seja utilizando o DNA ou a farinha de grãos GM ou não GM moídos, em função dos valores de delta Ct. Os valores de delta Ct são diretamente utilizados para determinar o percentual de OGMs presente nas amostras. Este método de quantificação relativa é denominado como método do delta Ct, no entanto, difere do método delta Ct tradicional, em que há apenas o emprego de uma fórmula aritmética para expressar diferenças entre a quantidade do gene alvo e amostras calibradoras em estudos de expressão gênica (LIVAK *et al.*, 2001).

Um fator decisivo para o sucesso da técnica de PCR quantitativo na quantificação de OGMs se refere ao tipo de padrões utilizados para a construção das curvas de calibração. Os padrões são amostras contendo quantidade específicas de DNA GM, expressos nas diferentes unidades, nanogramas, número de cópias ou percentual, que devem ser concomitantemente amplificados com as amostras do ensaio. Apenas com a amplificação destes padrões é possível a construção das curvas de calibração que permitem a determinação do percentual de resíduos transgênicos nas amostras.

Os padrões de calibração mais utilizados para a quantificação de resíduos transgênicos são os baseados em DNA genômico (gDNA), extraídos dos materiais de referência certificados (CRMs) pelo Institute for Reference Materials and Measurements (IRMN, Bélgica) (WURZ *et al.*, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 2000; BERDAL *et al.*, 2001; TERRY *et al.*, 2001). Estes padrões são obtidos pela mistura, em proporções específicas, normalmente 0,1% a 5,0%, de farinha do material GM com farinha do material não GM da espécie em questão. Além dos CRMs, diluições de DNA genômico de amostras 100% GM são também utilizadas em muitos ensaios descritos (VAÏTILINGOM *et al.*, 1999; ALARY *et al.*, 2002; ZEITLER *et al.*, 2002; DAHINDEN *et al.*, 2002; TERZI *et al.*, 2003).

O emprego de padrões de calibração baseados em gDNA apresenta algumas limitações e problemas de reprodutibilidade. Além das variações inerentes nas etapas de mistura e homogeneização das farinhas, existem ainda outras fontes de variações que podem interferir na precisão, como por exemplo, variações entre os

lotes de grãos utilizados. Estas variações podem ocorrer devido ao tipo de cultivar utilizado, quantidade de DNA por unidade de massa entre os grãos GM e não GM, níveis de heteroziguidade dos grãos com relação ao transgene, e ainda, no caso de plantas alógamas, qual a origem do endosperma (3C) dos grãos utilizados, se a planta GM utilizada era o genitor masculino ou feminino (TRIFA *et al.*, 2004).

Dentre as limitações, destaca-se o fato de que os CRMs disponíveis no mercado internacional variam apenas de 0,1% a 5% em peso de farinha do grão GM com relação ao peso de farinha do grão normal. Deste modo, a quantificação de amostras com percentuais superiores a 5% extrapola o intervalo de confiança da curva gerada. Outro fator crítico é que nem todos os eventos transgênicos liberados apresentam CRMs disponíveis e o custo destes padrões é bastante elevado.

Devido a estas limitações o desenvolvimento de padrões de calibração alternativos tem possibilitado a quantificação de eventos recentemente liberados em alguns países, como o caso do evento de milho MON 810. HOLCK *et al.* (2002) desenvolveram um método para a quantificação evento-específica do milho MON 810 utilizando amplicons híbridos, contendo os dois alvos, referência endógena e transgene, como padrões para a construção das curvas de calibração. A mesma metodologia foi utilizada por PARDIGOL *et al.* (2003) para a quantificação de soja Roundup Ready<sup>®</sup>(RR). Partes das regiões codificadoras do gene da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) e do gene da lectina foram amplificadas por PCR, purificadas e utilizadas como padrões. O emprego de plasmídios recombinantes contendo os fragmentos alvos clonados também tem sido descrito para quantificações eventos-específicas da soja RR. O sítio de integração do cassete transgene foi identificado e a região de junção entre o cassete e o genoma da soja foi clonado. As curvas de calibração obtidas foram capazes de quantificar com precisão amostras de CRMs e de alimentos que apresentavam percentuais de OGM previamente conhecidos (TAVANIERIS *et al.*, 2001).

Como alternativa para a quantificação de resíduos transgênicos para os mais variados tipos de eventos GM liberados, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de padrões de calibração baseados em pDNA, utilizando como alvo o promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor. Este promotor está presente na maioria dos eventos transgênicos liberados e, inclusive, nos dois eventos liberados para plantio e comércio no Brasil, a soja RR e o algodão Bollgard, resistentes ao herbicida glifosato e a lepidópteros (*Alabama argillacea*, *Pectinophora*

*gossypiellia* e *Heliothis virescens*), respectivamente. Espera-se a obtenção de curvas de calibração que permitam a quantificação do percentual de resíduos transgênicos, em diferentes tipos de alimentos, tanto pelo método da curva padrão como pelo método delta Ct, com precisão e acuracidade.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material de referência

Como material de referência para concentração de OGMs foram utilizados padrões de referência certificados (CRMs) produzidos pelo IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurement*) e comercializados pela Fluka, contendo as porcentagens de 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% em peso para a presença do evento transgênico de soja RR, com relação ao peso de farinha de soja normal.

### 2.2. Extração de DNA genômico

O DNA genômico dos CRMs foi extraído pelo método PrepMan (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante. O DNA de grãos e produtos *in natura* foi extraído pelos métodos CTAB (ROGERS & BENEDICH, 1988) ou Wizard™, este último disponível comercialmente (Promega). A extração de DNA de produtos com alto nível de processamento foi realizada pelos métodos CTAB ou Wizard, porém com diferentes adaptações, segundo características específicas dos produtos.

Após a extração, o DNA das amostras foi quantificado em espectrofotômetro na  $A_{260}$ . O fator de conversão de  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ ng/uL}$  foi utilizado para converter absorbância em unidades de concentração. Posteriormente, as amostras de DNA foram separadas por eletroforese em géis de agarose 1,8% (p/v), contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídeo imerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mmoles/L, EDTA 1 mmoles/L pH 8,0), e visualizadas por meio de luz ultravioleta.

### 2.3. Oligonucleotídeos e condições de amplificação por PCR qualitativo e quantitativo

Para a obtenção dos fragmentos a serem clonados, foram utilizados *primers* específicos para o gene da lectina, utilizado como controle endógeno (MEYER *et al.*, 1994; GenBank M30884), para a região promotora 35S (GenBank AJ308514), e ainda *primers* evento-específico para a região EPSPS da soja RR (GenBank AB180963).

As reações de PCR qualitativo foram realizadas em um volume final de 25  $\mu$ L contendo 2,5 mmoles/L de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, 0,2 pmoles de cada *primer*, KCl 50 mmoles/L, Tris-HCl 10 mmoles/L pH 8,3 e MgCl<sub>2</sub> 1,5 ou 2,0 mmoles/L e cerca de 100 ng de DNA das amostras. A amplificação foi conduzida em termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 9700 PCR System (Applied Biosystems), com período inicial de desnaturação a 94°C, por 4 min, seguido por 35 ciclos de polimerização (94°C por 30 s, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min) e período adicional de polimerização a 72° C por 7 min. Para cada par de oligonucleotídeos foi utilizada a temperatura de anelamento mais apropriada.

Reações de PCR em tempo real foram conduzidas em equipamento ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). A amplificação dos fragmentos 35S e Lectina, foi realizada utilizando-se a metodologia SYBR Green. As amostras foram amplificadas para ambos os alvos, transgene e referência endógena, em diferentes tubos, na mesma placa de reação. Diferentes quantidades do DNA plasmidial alvo ou cerca de 200 ng das amostras de alimentos, e 0,2 pmoles de cada *primer* foram adicionados ao tampão SYBR Green master mix, contendo todos os componentes necessários à amplificação (as enzimas uracil N-glicosilase e AmpliTaq Gold, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, KCl e o fluoróforo SYBR green), em um volume final de 50  $\mu$ L.

Em cada placa, foram amplificadas amostras controle, que apresentavam todos os reagentes necessários à amplificação, exceto DNA. As condições de termociclagem foram 50°C por 2 min, para permitir a ação da uracil N-glicosilase, 95°C por 10 min para a ativação da DNA polimerase e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, seguida de 60°C por 1 min, para anelamento dos *primers* e amplificação. Ao final dos 40 ciclos de amplificação, um período adicional de 30 min, com elevação gradual da temperatura de 60°C a 94°C, foi utilizado para obtenção da curva de dissociação.

## 2.4. Obtenção dos fragmentos

A amostra de material de referência certificado (CRM), contendo 5,0% do evento soja RR (Fluka), foi amplificada com os *primers* Lec-F QT e Lec-R QT, RR-F QT e RR-R QT e 35S-F e 35S-R para obtenção dos fragmentos a serem clonados (Quadro 1). Após a amplificação, os fragmentos foram purificados do gel de agarose, pela técnica de absorção de DNA em membrana de sílica-gel, utilizando-se o “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante. Os fragmentos de DNA purificados foram quantificados, após a separação por eletroforese em géis de agarose 1%, contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídeo, imerso em Tampão TBE 1X, e visualizadas por meio de luz ultravioleta.

QUADRO 1 - Sequência de *primers* e sondas utilizados nas reações de PCR qualitativo e quantitativo.

Alvo	Primers	Sequência	Amplicon
Gene Lectina	Lec-F QT	5´-TCCACCCCCATCCACATTT-3´	92 pb
	Lec-R QT	5´-GGCATAGAAGGTGAAGTTGAAGGA-3´	
	Sonda-Lec	5´-VIC-ACCCGGTAGCGTTGCCAGCTTCG-TAMRA-3´	
Região codificadora EPSPS	RR-F QT	5´-GCCATGTTGTTAATTTGTGCCAT-3´	82 pb
	RR-R QT	5´-GAAGTTCATTTTCATTTGGAGAC-3´	
	Sonda-RR	5´-6-FAM-CTTGAAAGATCTGCTAGAGTCAGCTTGTGTCAGCG-TAMRA-3´	
Promotor 35S	35-S	5´-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3´	209 pb
	35-R	5´-GCTCCTACAAATGCCATCATTGCG-3´	

## 2.5. Clonagem dos fragmentos

O vetor utilizado para as clonagens dos fragmentos foi o pGEM<sup>®</sup>-TEasy (Promega). As reações de ligação dos fragmentos de DNA ao vetor foram realizadas usando-se a enzima T4 DNA ligase em volume final de 10-15 µL, de acordo com as técnicas de clonagem descritas por SAMBROOK *et al.* (1989) e por AUSUBEL *et al.* (1998). As reações de ligação foram conduzidas em Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/L; ATP 1 mmol/L; DTT 1 mmol/L; polietilenoglicol 8.000 5%; o

fragmento de DNA a ser clonado e o vetor, na relação de 3:1; e T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 4 °C por 24 horas. As células competentes, *E. coli* DH5 $\alpha$ , foram preparadas de acordo com INOUE *et al.* (1990). A transformação foi realizada por choque térmico, adicionando-se 10 a 15  $\mu$ L da reação de ligação a 200  $\mu$ L de células competentes, sendo a suspensão mantida no gelo, por 30 minutos. Após o choque térmico de dois minutos, a 42°C, 800  $\mu$ L de meio SOB (extrato de levedura 0,5%, triptona 2%, NaCl 10 mmoles/L, KCl 2,5 mmoles/L, MgCl<sub>2</sub> 10 mmoles/L, MgSO<sub>4</sub> 10 mmoles/L e glicerol 10%) foi adicionado, prolongando-se a incubação por mais 1 hora a 37°C. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100  $\mu$ L de meio SOB e espalhadas em placas contendo meio LB com ampicilina a 100  $\mu$ g/mL, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo) e IPTG (isopropiltio- $\beta$ -galactosídeo), para a seleção dos clones transformantes e recombinantes.

A confirmação da clonagem se deu pela clivagem do DNA plasmidial para a liberação dos fragmentos e sequenciamento. Cerca de 600 ng de DNA plasmidial foram digeridos com 2,5 U da enzima *EcoR* I, por 3 horas a 37°C. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídeo. Os clones foram sequenciados usando-se o ABI PRISM BigDye III Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Este kit é adequado para o seqüenciamento de DNA usando o ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências de nucleotídeos dos clones isolados foram analisadas pelo Programa *Seqman* do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.) e a busca por similaridades com outras seqüências de DNA depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) foi feita usando o programa *BLASTn* (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

## **2.6. Extração de DNA plasmidial**

Inicialmente as células hospedeiras *E. coli* DH5 foram rompidas pelo método de lise alcalina e o volume das soluções ajustado de acordo com o volume inicial da cultura. Basicamente, a bactéria transformada foi crescida em meio LB a 37°C, contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, por 12 a 16 h. Após centrifugação a 5.000 g, por 2 min, a 4°C, as células foram ressuspensas na solução I (glicose 50 mmoles/L, Tris-HCl 25 mmoles/mL pH 8,0, EDTA 20 mmoles/L e RNase A 100  $\mu$ g/mL). Em seguida, a solução II (lise) (NaOH 0,2 moles/L e SDS 1%) foi

adicionada e a mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. A essa mistura foi adicionada a solução III (acetato de potássio 1mol/L), prolongando-se a incubação por mais 15 min. O DNA foi separado dos resíduos insolúveis e do DNA cromossômico por meio de centrifugação a 11.000 g, por 10 min. O DNA plasmidial foi isolado do sobrenadante usando a resina pré-empacotada “QIAprep Spin” e “QIAGEN tipo 100” (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante.

## **2.7. Quantificação do DNA plasmidial**

Após extração, o DNA plasmidial foi cuidadosamente quantificado utilizando o equipamento Gene Quant Pro spectrophotometer (Amersham). O fator de conversão da absorbância em unidades de concentração foi  $1 \text{ OD}_{260}=50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Cada amostra de DNA plasmidial foi quantificada em triplicata, e em diferentes diluições: 1:10; 1:25 e 1:50. A pureza foi constatada pela razão  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{230}$ . A subtração do *background* no comprimento de onda a 320 nanômetros foi realizada.

A concentração média obtida por espectrofotômetro foi também avaliada em géis de agarose 1,8% (p/v), contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídeo. Um gradiente de concentração conhecido do DNA do fago lambda (Sigma) foi utilizado para comparação visual.

## **2.8. Construção das curvas de calibração baseadas em p-DNA para Quantificação de OGMs**

### **a) Quantificação Relativa pelo Método da Curva Padrão**

Para a construção das curvas de calibração baseadas em número de cópias de pDNA para a quantificação relativa pelo “método da curva padrão”, uma diluição seriada foi preparada variando de  $10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 a 1 molécula de DNA plasmidial por reação de amplificação para cada um dos alvos: 35S e lectina. A determinação da massa de DNA plasmidial presente em cada diluição foi estimada considerando-se o tamanho do plasmídeo recombinante (vetor + fragmento) e seu peso molecular (HERNANDEZ *et al.*, 2003; APPLIED BIOSYSTEMS, 2003). No caso do plasmídeo contendo o alvo 35S, com tamanho total de 3210 pb, a massa correspondente a uma cópia do plasmídeo recombinante

foi estimada em  $3,518 \times 10^{-6}$  pg. Seguindo o mesmo raciocínio, uma cópia do plasmídeo recombinante para o alvo lectina apresenta a massa de  $3,21 \times 10^{-6}$  pg.

Em cada curva, o logaritmo do número inicial de cópias de cada diluição foi plotado em função dos valores de Ct e a equação que descreve a variação dos valores de Ct em função do número de cópias amplificadas foi gerada. Cada diluição da curva foi amplificada em duplicata em três reações independentes, de modo que foram geradas três diferentes curvas para cada um dos alvos.

A reprodutibilidade das curvas foi demonstrada pela comparação dos valores médios de Ct obtidos, em cada diluição, entre as três curvas geradas, e seus respectivos valores de desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV (%)). Foram ainda determinados o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), índice de inclinação da reta, valor em que a reta cruza o eixo y (y-intercepto) e a eficiência de amplificação de cada alvo, parâmetros considerados relevantes nas análises de quantificação por PCR em tempo real.

#### **b) Quantificação Relativa pelo Método do delta Ct**

Para a construção da curva de calibração baseada em número de cópias de pDNA para a quantificação relativa pelo “método do delta Ct”, os dois plasmídios, um contendo a referência endógena e o outro o fragmento transgênico 35S, foram misturados nas devidas proporções a fim de se obter padrões com 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0,01% do alvo transgênico com relação ao alvo endógeno. O número total de cópias do alvo lectina em cada padrão foi  $2 \times 10^5$  cópias, enquanto do alvo 35S variou de  $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  a 20 cópias.

Em cada curva, o logaritmo do número de cópias inicial de cada diluição foi plotado em função dos valores de delta Ct e a equação que descreve a variação dos valores de delta Ct em função do número de cópias amplificadas foi gerada. Cada padrão foi amplificado em duplicata em três reações independentes.

A reprodutibilidade das curvas foi demonstrada pela comparação dos valores médios de delta Ct obtidos, em cada diluição, entre as três curvas geradas, e seus respectivos valores de SD e CV%. Foram também determinados o valor de  $R^2$ , o índice de inclinação da reta, o y-intercepto e a eficiência de amplificação.

Para a avaliação do potencial uso das curvas de calibração baseadas em pDNA na quantificação relativa de OGM, ambas as curvas geradas com pDNA, as

que usam os valores de Ct e delta Ct, foram comparadas com uma curva baseada em gDNA construída com os CRMs 0,1% a 5,0%. Para a construção da curva baseada em gDNA, cerca de 100 ng de cada um dos CRMs foram utilizados para a amplificação por PCR quantitativo utilizando os mesmos *primers* e condições de amplificação utilizados para gerar as curvas com pDNA. Cada CRM foi amplificado em duplicata em três diferentes corridas. A diferença entre os valores de Ct para o alvo transgênico e para a referência endógena, foi plotada em função do logaritmo da porcentagem de OGM.

### **2.9. Determinação da acuracidade e precisão da quantificação de OGMs utilizando curvas de calibração baseadas em pDNA**

As curvas de calibração baseadas no número de cópias plasmídias foram avaliadas quanto à acuracidade e precisão pela determinação do percentual de resíduos transgênicos presente nos CRMs contendo valores definidos de 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0% de soja RR. Os CRMs foram tratados como amostras com percentuais de OGM desconhecidos. Foram utilizadas as curvas baseadas em pDNA obtidas previamente e a quantificação relativa foi determinada pelo método da curva padrão e do delta Ct.

Para a quantificação relativa baseada no “método da curva padrão”, o conteúdo de DNA GM, expresso em porcentagem relativa ao conteúdo total de DNA de soja, foi calculado pela razão entre o número de cópias do alvo 35S e o número de cópias do alvo lectina para cada amostra avaliada. O número de cópias de cada alvo foi determinado pelo emprego das curvas p-DNA para os alvos transgene e referência endógena, que empregaram o método da curva padrão, obtidas previamente.

Para a quantificação relativa baseada no “método do delta Ct”, foram utilizadas as curvas de calibração construídas anteriormente a partir da amplificação da mistura dos dois plasmídios, um contendo a referência endógena e o outro o fragmento transgênico 35S clonado, nas proporções de 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0,01% do alvo transgênico com relação ao alvo endógeno.

Cada CRM foi quantificado em duplicata em três reações de amplificação independentes. A partir dos dados obtidos, estabeleceu-se uma comparação entre os percentuais de DNA GM presente em cada CRM, de acordo com a curva de calibração empregada. A acuracidade e precisão referente aos percentuais da

presença de OGM obtidos para cada CRM será estimada pelo SD, CV (%), erro médio e taxa de recuperação (%R).

#### **2.10. Determinação do conteúdo de soja GM em amostras de alimentos utilizando curvas de calibração baseadas em pDNA**

O potencial uso das curvas de calibração baseadas em pDNA, previamente desenvolvidas, na quantificação de resíduos transgênicos em amostras de alimentos, foi testado em sete diferente produtos: salsicha, empanado, matinais, farinha de trigo, ração, farelo de soja e soja grão. A quantificação do percentual de soja GM nas diferentes amostras utilizando as curvas pDNA, pelos métodos do delta Ct e da curva padrão, foi comparada com a curva baseada em gDNA, pelo método delta Ct, construída com os CRMs de 0,1%, a 5,0% de soja RR.

Cada amostra foi quantificada em duplicata em três reações de amplificação independentes. A partir dos dados obtidos foi estabelecida uma comparação entre os percentuais de DNA GM obtidos para cada amostra pelo emprego de cada uma das curvas de calibração. A precisão referente aos percentuais da presença de OGM obtidos para cada amostra foi estimada pelo SD e CV (%).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Obtenção dos fragmentos e clonagem

Os amplicons de 92, 82 e 209 pb foram obtidos após a amplificação com os *primers* específicos para os alvos: gene que codifica para a referência endógena lectina, região codificadora EPSPS e região promotora 35S, respectivamente (Figura 1 e 2). Após a amplificação, os fragmentos foram purificados do gel de agarose e clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-TEasy (Promega).

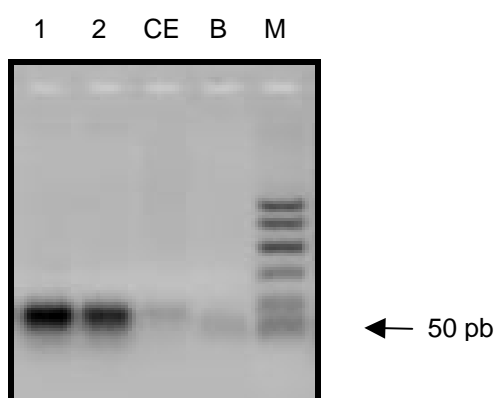


FIGURA 1 – Análise eletroforética dos fragmentos de PCR clonados. As amostras foram amplificadas com *primers* específicos para o gene lectina (1) e região codificadora EPSPS (2). CE: Controle de Extração; B: Branco e M: marcador de tamanho (50 bp DNA Ladder - Promega).

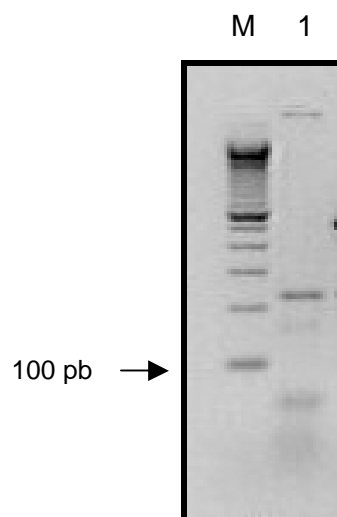


FIGURA 2 – Análise eletroforética dos fragmentos de PCR a serem clonados. A amostra foi amplificada com os *primers* específicos para a região promotora 35S (1); M: marcador de tamanho (100 bp DNA Ladder - Invitrogen).

A confirmação da clonagem se deu pela clivagem do DNA plasmidial e liberação dos fragmentos, seguida do seqüenciamento dos clones (Figura 3 e Quadro 2, respectivamente). Todos os três clones apresentaram os tamanhos esperados e foram denominados de p-35S, p-Lec e p-RR, contendo os fragmentos, parte do promotor 35S, do gene de lectina de soja e da região codificadora EPSPS, respectivamente. Para confirmar se os fragmentos clonados realmente se referiam aos esperados, as seqüências obtidas foram analisadas no programa *Seqman* (DNASTAR Inc.) e comparadas com as seqüências depositadas no *GenBank* utilizando a ferramenta de alinhamento de nucleotídeos *Blastn*. Os três clones, p-35S, p-Lec e p-RR, apresentaram elevados graus de identidade e similaridade com as seqüências dos respectivos genes, conforme demonstrado pelos valores P (Quadro 2).

### 3.2. Quantificação do DNA plasmidial

Para a construção das curvas de calibração baseadas no número de cópias de plasmídios recombinantes, o DNA plasmidial de cada um dos clones foi cuidadosamente quantificado por espectrofotômetro e em géis de agarose contendo padrões de concentração de DNA conhecidos.

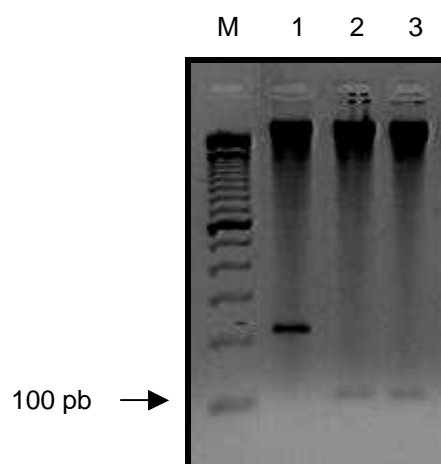


FIGURA 3 – Análise de restrição para confirmação da clonagem dos fragmentos. Cerca de 600 ng de DNA plasmidial de cada um dos clones: p-35S (1), p-Lec (2) e p-RR (3), foram clivados com a enzima *Eco* RI por 3 h a 37°C, para liberação dos fragmentos. M: marcador de tamanho (100 bp DNA Ladder - Invitrogen).

O DNA foi preparado em diferentes diluições, cada uma delas em três repetições, para a quantificação nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nanômetros. A subtração do *background* no comprimento de onda a 320 nm foi realizada.

Os valores de absorvância para cada uma das diluições, bem como as concentrações obtidas, podem ser observadas na Tabela 1. A concentração média para o clone p-Lec foi de 60,18 ng/μL e para o p-35S foi de 50,00 ng/μL. Os valores médios de concentração obtidos para cada um dos clones foram confirmados pela comparação visual com diferentes concentrações de DNA do fago lambda em gel de agarose.

Em todas as diluições avaliadas, a pureza do DNA dos clones foi satisfatória, com a razão  $A_{260}/A_{280}$  compreendidas entre os valores de 1,8 e 2,0. Uma razão menor que o intervalo indica contaminação com proteínas, e maior, com compostos orgânicos. O valor da absorvância a 230 nm também é uma indicação da pureza das amostras. Uma elevada absorvância a 230 nm indica contaminação com impurezas que podem afetar reações enzimáticas (PCR e digestão com enzimas de restrição) ou com tampões como Tris ou EDTA (ácido etileno diamino tetracético) (BRASILEIRO & CARNEIRO., 1998), que podem interferir na eficiência de amplificação. Em todas as diluições testadas os valores de  $A_{230}$  foram inferiores a 0,055.

QUADRO 2 – Seqüências de DNA dos clones p-35S, p-Lec e p-RR e suas respectivas similaridades com seqüências depositadas no *GenBank*.

Clone	Seqüência	Região Gênica	Valor P	Número de Acesso no <i>GenBank</i>
<b>p-35S</b>	1 ACTAGTGATTGCTCCTACAAATGNCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCAT 50	Região de interseção entre o promoter 35S e o peptídeo sinal para cloroplasto da soja transgênica ( <i>Glycine max</i> ) Roundup Ready CP4-EPSPS	$3e^{-100}$	AB209952
	51 CGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTAGTCCCAAAGATGGACCCCA			
	101 CGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAA			
	151 GTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCA			
	201 CTATCAATC - 209			
<b>p-Lec</b>	1 GGCATAGAAGGTGAAGTTGAAGGAAGCGGCGAAGCTGGCAACGCTACCGG 50	Gene Lectina da soja (Lec 1)	$6e^{-30}$	M30884
	51 TTTCTTTGTCCCAAATCTTGATGGGTGTGGAATCATTGTAGA - 92			
<b>p-RR</b>	1 TATGTTGTTAATTTGGCCATTCTTGAAAGATCTGCTAGAGTCAGCTTGTC 50	Cultivar de soja ( <i>Glycine max</i> ) transgênica Roundup Ready CP4-EPSPS	$5e^{-27}$	AY592954
51 GCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCATC - 82				

Valor P – probabilidade de que a similaridade entre as seqüências seja devido ao acaso;

TABELA 1 – Determinação da pureza e concentração das amostras de DNA plasmidial dos clones p-Lec e p-35S por espectrofotômetro. Cada plasmídeo foi quantificado nas diluições 1:10, 1:25 e 1:50 e cada diluição foi quantificada em triplicata nos comprimentos de onda 230, 260 e 280 nanômetros. A subtração do *background* no comprimento de onda a 320 nanômetros foi realizada.

Amostra	Diluição	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	ng/ul	Concentração Média (ng/μL)	Média Geral (ng/μL)
p-Lec.1	1:10	0,0150	0,1235	0,0686	1,80	61,73	59,99	60,18
p-Lec.2		0,0240	0,0977	0,0493	1,98	48,87		
p-Lec.3		0,0000	0,1388	0,0770	1,80	69,39		
p-Lec.1	1:25	0,0180	0,0500	0,024	2,08	62,50	53,28	
p-Lec.2		0,0000	0,0399	0,021	1,89	49,84		
p-Lec.3		0,0000	0,0380	0,021	1,80	47,50		
p-Lec.1	1:50	0,0000	0,0302	0,0170	1,78	75,50	67,27	
p-Lec.2		0,0000	0,0285	0,0169	1,69	71,35		
p-Lec.3		0,0000	0,0220	0,0112	1,96	54,95		
p-35S.1	1:10	0,0495	0,0913	0,0471	1,94	45,67	56,35	
p-35S.2		0,0549	0,1280	0,0694	1,85	64,00		
p-35S.3		0,0057	0,1188	0,0655	1,81	59,39		
p-35S.1	1:25	0,0080	0,0380	0,0200	1,90	47,50	49,91	50,00
p-35S.2		0,0000	0,0422	0,0222	1,90	52,73		
p-35S.3		0,0000	0,0396	0,0209	1,89	49,50		
p-35S.1	1:50	0,0150	0,0150	0,0079	1,90	37,39	43,75	
p-35S.2		0,0000	0,0185	0,0096	1,94	46,35		
p-35S.3		0,0000	0,0190	0,0107	1,78	47,50		

A pureza das amostras tem influência significativa nos resultados de quantificação por espectrofotômetro. Algumas substâncias contaminantes, como por exemplo, proteínas, RNA e compostos orgânicos, absorvem luz em comprimentos de onda próximos a 260 nm, elevando os valores da concentração de DNA obtidos. Uma das vantagens de se utilizar DNA plasmidial na construção das curvas de calibração é a obtenção de DNA de melhor qualidade quando comparado às amostras extraídas de material vegetal. Amostras plasmidiais apresentam menor contaminação com compostos fenólicos e polissacarídeos (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

### **3.2. Construção das curvas de calibração baseada em pDNA**

#### **a) Curva para quantificação relativa baseada no método da curva padrão**

Para a construção das curvas de calibração baseadas em pDNA para a quantificação relativa pelo método da curva padrão, os valores médios de Ct obtidos para as diferentes diluições dos plasmídios p-35S e p-Lec foram plotados em função do logaritmo do número de cópias. Os valores médios de Ct obtidos nas três diferentes corridas, bem como os valores de SD e CV (%) correspondentes, podem ser visualizados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente, enquanto que as curvas geradas estão apresentadas na Figura 4.

A comparação entre os valores médios de Ct obtidos em cada diluição demonstrou alto índice de estabilidade, o que resultou na elaboração de curvas com significativa reprodutibilidade para ambos os alvos. Os valores de CV (%) para as curvas p-Lec e p-35S variaram apenas de 0,16% a 3,26%, enquanto que os de SD ficaram entre 0,06 e 1,11. Os valores médios de Ct mínimo e máximo, que refletem a quantidade de DNA alvo presente nos pontos extremos da curva, foram obtidos conforme o esperado, nas diluições com 1.000.000 e 1 cópia do pDNA, respectivamente, para ambos os alvos, refletindo a linearidade das curvas (KURNET *et al.*, 2006). Para as diluições do p-35S, o Ct mínimo foi 20,85 e o máximo 39,96, enquanto para as de p-Lec foram de 19,24 e 39,61, respectivamente.

TABELA 2 – Repetibilidade das curvas de calibração pDNA obtidas para alvo p-35S. Os valores médios de Ct, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV %) para cada diluição dos plasmídios recombinantes foram calculados utilizando o total de seis diferentes medidas.

Número de Cópias do Alvo 35S	Replicatas	Valores de Ct			Média	SD	CV (%)
		Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
1.000.000	1	21,45	20,51	20,50	20,85	0,46	2,21
	2	21,38	20,41	20,89			
500.000	1	22,10	21,37	21,21	21,50	0,47	2,20
	2	22,07	21,25	20,98			
100.000	1	23,89	24,30	24,24	24,08	0,19	0,80
	2	23,83	24,17	24,03			
50.000	1	26,21	25,37	25,31	25,91	0,72	2,77
	2	26,96	25,19	26,39			
10.000	1	28,28	28,26	28,34	28,39	0,32	1,14
	2	28,19	28,23	29,05			
1.000	1	30,41	31,39	31,54	30,85	0,90	2,92
	2	29,27	31,62	30,87			
100	1	34,96	34,78	34,80	35,06	0,46	1,31
	2	34,82	35,02	35,98			
10	1	36,89	38,69	38,32	38,05	0,65	1,70
	2	37,91	37,96	38,53			
1	1	39,89	40,00	40,00	39,96	0,06	0,16
	2	39,87	40,00	40,00			
NTC		39,91	39,72	40,00			
Coeficiente de Correlação (R <sup>2</sup> )		0,9888	0,9928	0,9886	0,9926		

TABELA 3 – Repetibilidade das curvas de calibração pDNA obtidas para alvo p-Lec. Os valores médios de Ct, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV %) para cada diluição dos plasmídios recombinantes foram calculados utilizando o total de seis diferentes medidas.

Número de Cópias do Alvo Lectina	Replicatas	Valores de Ct			Média	SD	CV (%)
		Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
1.000.000	1	18,77	19,69	19,69	19,24	0,61	3,17
	2	18,53	18,78	19,97			
500.000	1	19,86	21,33	21,63	20,99	0,68	3,26
	2	20,52	21,54	21,06			
100.000	1	22,53	24,19	24,10	23,67	0,70	2,95
	2	23,08	24,20	23,90			
50.000	1	25,78	25,18	26,14	25,58	0,48	1,88
	2	25,20	26,10	25,10			
10.000	1	28,46	27,79	27,91	27,94	0,49	1,75
	2	28,36	28,02	27,09			
1.000	1	31,57	31,51	31,98	31,43	0,56	1,79
	2	31,12	31,75	30,64			
100	1	33,52	35,62	35,63	35,00	1,11	3,18
	2	33,63	35,63	35,98			
10	1	36,58	37,97	37,99	37,34	0,77	2,06
	2	36,28	38,00	37,24			
1	1	40,00	40,00	39,81	39,61	0,71	1,79
	2	38,19	39,63	40,00			
NTC		40,00	39,91	40,00			
Coeficiente de Correlação (R <sup>2</sup> )		0,9765	0,9849	0,9882	0,9881		

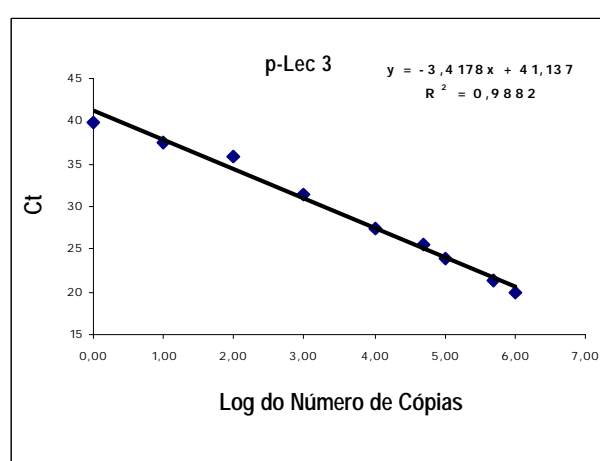
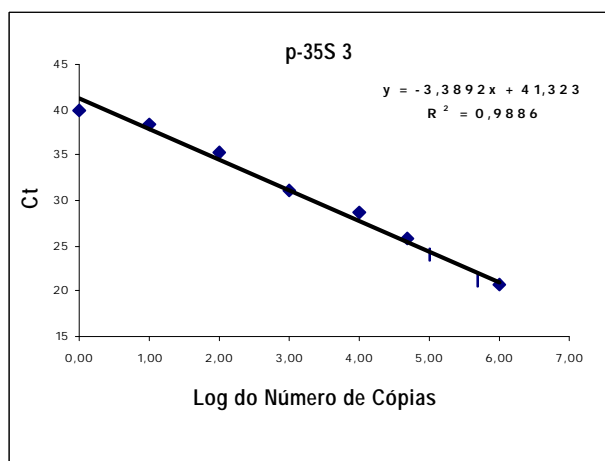
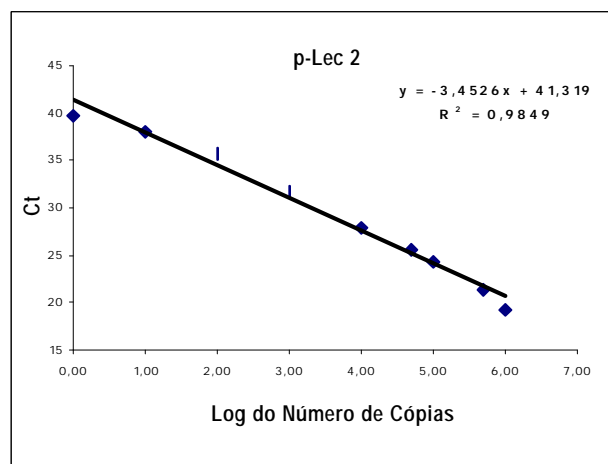
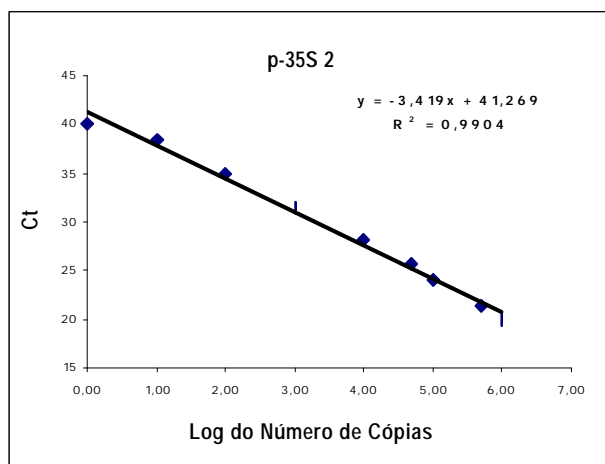
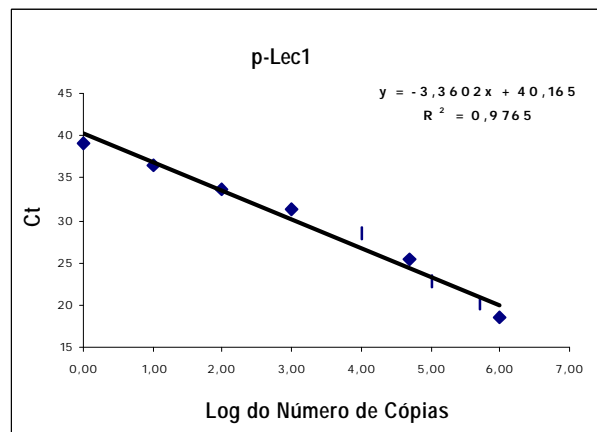
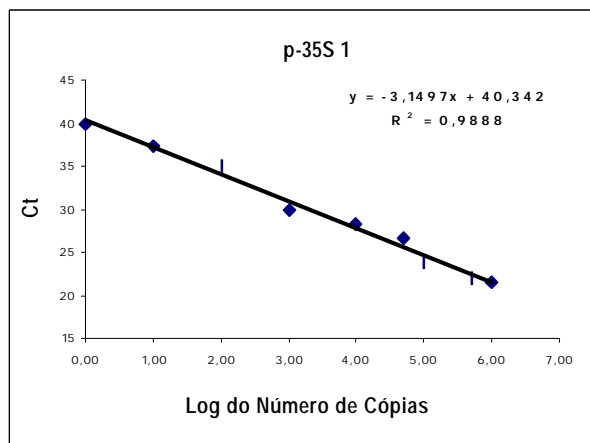


FIGURA 4 – Curvas de calibração para quantificação relativa pelo método da curva padrão. As curvas foram obtidas pela interpolação do logaritmo do número de cópias dos plasmídios p35S e p-Lec em função dos valores de Ct. Cada curva foi gerada em três corridas independentes sob condições de repetibilidade .

Dentre os parâmetros que indicam a qualidade das curvas de calibração destacam-se os valores de  $R^2$ . Este coeficiente indica o nível de correlação entre o número de cópias de pDNA em cada diluição e os valores de Ct obtidos. Para a quantificação do percentual de resíduos transgênicos utilizando curvas de calibração, o valor mínimo aceitável de  $R^2$  é de 98% (TAVANIERS *et al.*, 2004). Em todas as três curvas geradas para o alvo 35S os valores de  $R^2$  foram superiores a 98%. Para o alvo lectina, apenas na primeira repetição, a curva gerada apresentou valor de  $R^2$  inferior, de 97,65%. Os valores médios de  $R^2$  para o p-35S foi de 99,26% enquanto para o p-Lec foi de 98,59%.

#### **b) Curva para quantificação relativa baseada no método do delta Ct**

As curvas de calibração para quantificação relativa pelo método do delta Ct foram construídas misturando-se os dois plasmídios, p-35S e p-Lec, nas devidas proporções, a fim de se obter padrões com 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1% e 0,01% do alvo transgênico com relação ao alvo endógeno (%OGM). A partir dos valores de Ct, obtidos para cada um dos alvos, os valores de delta Ct foram determinados. Nas três diferentes curvas geradas os valores médios de delta Ct para cada um dos padrões foi plotado em função do logaritmo da %OGM. Os valores médios de delta Ct obtidos nas três diferentes corridas, bem como os valores de SD e CV (%) correspondentes, podem ser visualizados na Tabela 4, enquanto que as curvas geradas estão apresentadas na Figura 5.

Os valores médios de delta Ct obtidos para cada um dos padrões foram similares nas diferentes repetições, conforme demonstrado pelos valores de SD, que não ultrapassaram 1,5. A estabilidade das curvas também foi confirmada pelos valores de CV (%). Excetuando-se a amostra com 25% de OGM, todos os demais desvios em relação às médias foram inferiores à 10%. De acordo com os requerimentos de performance para validação de metodologias para quantificação de OGMs, os valores de CV (%) não devem ser superiores a 20% (PUUMALAINEM *et al.*, 2003). No entanto, desvios variando de 20% a 35% são reportados como comuns para experimentos de quantificação de OGMs que sejam validados apenas intralaboratorialmente (TAVANIERS *et al.*, 2004). Deste modo, embora o padrão 25% tenha apresentado desvios elevados entre os valores de delta Ct, também caracterizado pelo CV (%) de 28,22%, o valor obtido ainda foi considerado aceitável.

TABELA 4 – Repetibilidade das curvas de calibração pDNA baseadas no método delta Ct. Os valores médios de delta Ct entre os alvos p-35S e p-Lec, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV %) para cada um dos padrões obtidos pela mistura dos plasmídios recombinantes foram calculados utilizando o total de seis diferentes medidas.

% OGM	Replicatas	Valores de delta Ct			Média	SD	CV (%)
		Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
100	1	0,40	0,36	0,38	0,40	0,04	8,83
	2	0,42	0,46	0,39			
50	1	1,19	1,06	1,15	1,17	0,11	9,18
	2	1,37	1,16	1,10			
25	1	2,76	1,64	1,86	2,09	0,59	28,22
	2	2,94	1,69	1,69			
10	1	4,14	3,30	3,98	3,76	0,30	8,06
	2	3,84	3,54	3,77			
5	1	5,94	5,41	4,90	5,42	0,41	7,56
	2	5,82	5,07	5,36			
2,5	1	6,64	6,82	6,12	6,43	0,44	6,91
	2	5,83	6,19	6,95			
1,00	1	8,45	8,67	7,86	8,46	0,33	3,88
	2	8,73	8,69	8,38			
0,50	1	9,57	10,02	9,32	9,75	0,60	6,17
	2	10,70	9,91	8,98			
0,10	1	12,80	12,67	11,66	12,29	0,68	5,55
	2	12,60	12,80	11,21			
0,01	1	16,73	16,17	13,95	15,54	1,33	8,58
	2	17,01	15,38	14,00			
0,00	1	18,10	18,25	15,51	18,40	1,36	7,37
	2	19,02	18,40	18,32			
<b>Coeficiente de Correlação (R<sup>2</sup>)</b>		<b>0,9967</b>	<b>0,9918</b>	<b>0,9987</b>	<b>0,9957</b>		

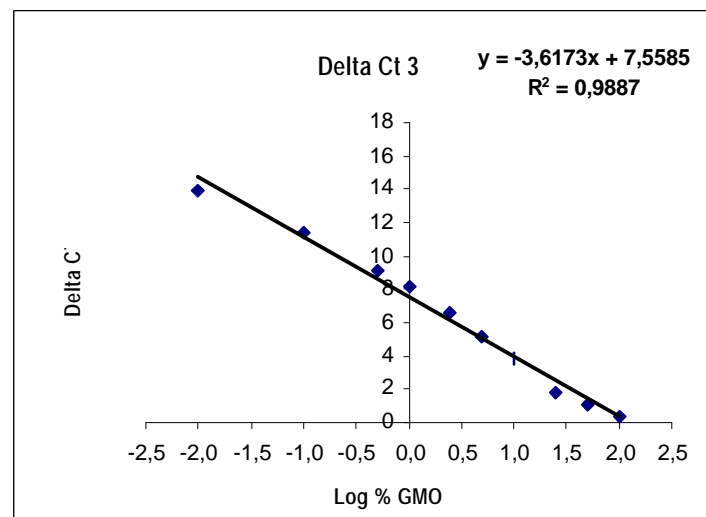
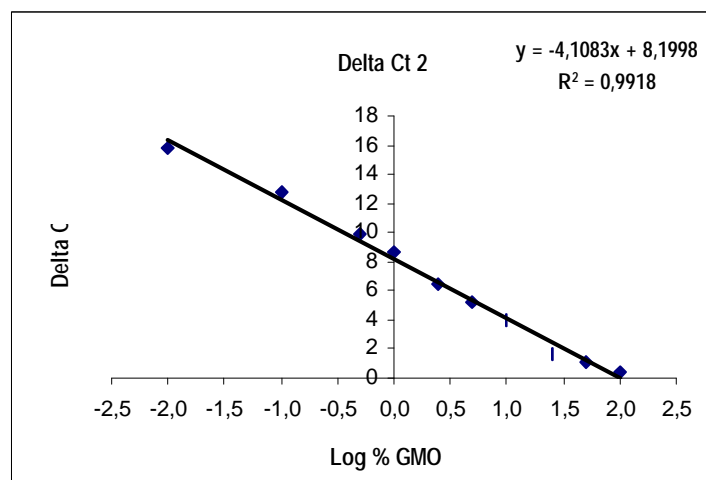
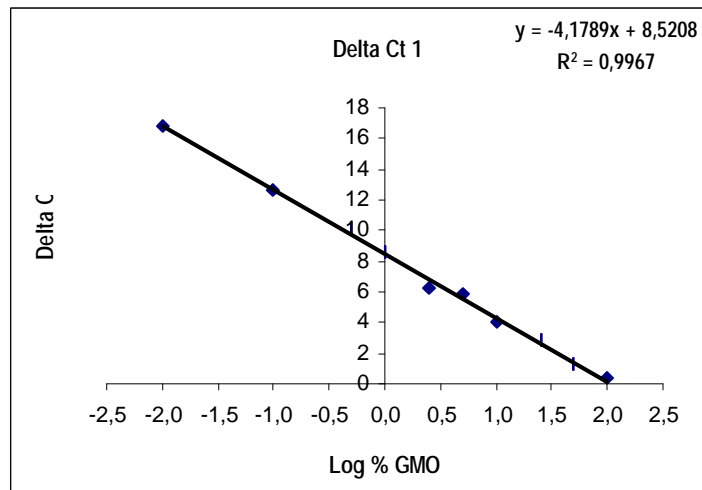


FIGURA 5 – Curvas de calibração para quantificação relativa pelo método do delta Ct. As curvas foram obtidas pela interpolação do logaritmo do percentual de OGM em função dos valores de delta Ct. Cada curva foi gerada em três corridas independentes sob condições de repetibilidade.

Nas curvas contruídas com os valores de delta Ct, o ponto máximo da curva deve apresentar o valor mínimo de delta Ct, e vice versa. Nas três diferentes curvas geradas os padrões contendo 0,01% apresentaram o valor médio de delta Ct de 15,54, enquanto que os de 100% apresentaram o valor de 0,40, caracterizando os extremos da curva, conforme esperado para curvas que apresentam níveis satisfatórios de linearidade. Além de ter sido possível ampliar a faixa de trabalho da curva, de 0,01% a 100%, quando comparados com os CRMs que variam apenas de 0,1 a 5,0%, a curva apresentou uma linearidade satisfatória, que pode ser confirmada pelos valores de  $R^2$ , que atingiu o valor médio de 99,57%.

### **3.3. Construção das curvas de calibração baseada em gDNA**

DNA genômico extraído dos CRMs, contendo de 0,1 a 5,0% de resíduo transgênico, foi utilizado para construção curvas de calibração pelo método do delta Ct. Estas curvas foram utilizadas para a análise comparativa com as baseadas em pDNA. Os valores médios de delta Ct obtidos nas três diferentes corridas, bem como os valores de SD e CV (%) correspondentes, podem ser visualizados na Tabela 5, enquanto que as curvas geradas estão apresentadas na Figura 6.

Assim como as curvas baseadas em pDNA, as curvas construídas a partir de gDNA também apresentaram elevado índice de repetibilidade, com os valores de SD variando de 0,25 a 1,28, enquanto que os de CV (%) permaneceram entre 4,89% e 9,80%. Os CRMs 0,1% e 5,0% apresentaram os valores máximo e mínimo de delta Ct de 11,70 e 5,20, respectivamente, condizentes com os pontos extremos da curva. O valor médio de  $R^2$  de 99,51%, evidenciou a alta correlação entre os diferentes CRMs e os valores de delta Ct correspondentes.

Com base nos resultados conclui-se que as curvas de calibração construídas a partir de DNA plasmidial, obtidas tanto com os plasmídios sozinhos (método da curva padrão) quanto em uma mistura (delta Ct), apresentaram níveis de repetibilidade similares quando foram empregados os CRMs. Os menores valores de SD e CV (%) foram estimados para as curvas baseadas em pDNA, quando utilizada a metodologia da curva padrão, enquanto que o maior valor médio de  $R^2$  foi obtido a partir das curvas de pDNA pelo método do delta Ct.

TABELA 5 – Repetibilidade das curvas de calibração baseadas gDNA. Os valores médios de delta Ct, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV %) para cada um dos CRMs foram calculados utilizando o total de seis diferentes medidas.

% OGM	Replicatas	Valores de delta Ct			Média	SD	CV (%)
		Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3			
5,00	1	5,36	5,22	4,87	5,20	0,25	4,89
	2	5,52	5,28	4,92			
2,00	1	6,82	7,01	6,21	6,57	0,51	7,77
	2	6,99	6,65	5,72			
1,00	1	8,21	7,90	6,78	7,67	0,66	8,61
	2	8,42	7,75	6,97			
0,50	1	8,79	9,79	8,76	9,30	0,58	6,22
	2	9,16	10,20	9,08			
0,10	1	11,26	12,49	11,20	11,70	0,72	6,14
	2	12,39	12,09	10,76			
0,00	1	13,01	14,63	11,46	13,05	1,28	9,80
	2	12,91	14,39	11,89			
Coeficiente de Correlação (R <sup>2</sup> )		0,9951	0,9857	0,9783	0,9951		

Alguns parâmetros derivados das curvas de calibração, além de permitirem verificar a qualidade das curvas, como o R<sup>2</sup>, também proporcionam medidas comparativas. Dentre estes, destacam-se o valor do y-intercepto e o índice de inclinação da reta. Uma comparação entre os valores de R<sup>2</sup>, eficiência de amplificação, índice de inclinação, desvio do valor do intercepto obtido em cada uma das curvas pDNA e gDNA pode ser observada na Tabela 6.

A inclinação da reta em cada curva de calibração obtida permite estimar os valores de eficiência de amplificação de cada alvo amplificado por PCR. Uma inclinação de -3,32 indica uma eficiência de amplificação teórica de 100% (GINZINGER, 2002). Nas curvas pDNA obtidas pelo método da curva padrão, os plasmídios contendo o alvo 35S apresentaram uma eficiência média de amplificação de 100%, enquanto os contendo o alvo lectina a eficiência foi inferior, com 96,38%. O valor máximo de eficiência para o alvo lectina foi de 98,40%, obtida na primeira repetição da curva. O emprego da quantificação relativa requer que ambos os alvos apresentem eficiência de amplificação por PCR similares e preferencialmente superiores a 90%. Embora tenham sido detectadas diferenças nas eficiências de amplificação entre os alvos p-Lec e p-35S, diferenças similares foram consideradas aceitáveis em ensaios de validação de curvas baseadas em pDNA para a

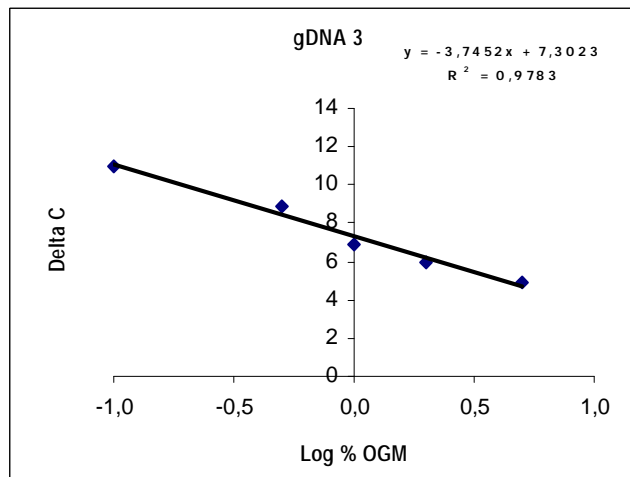
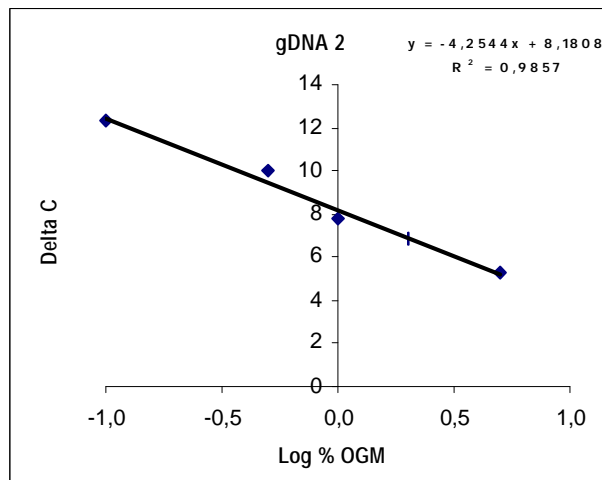
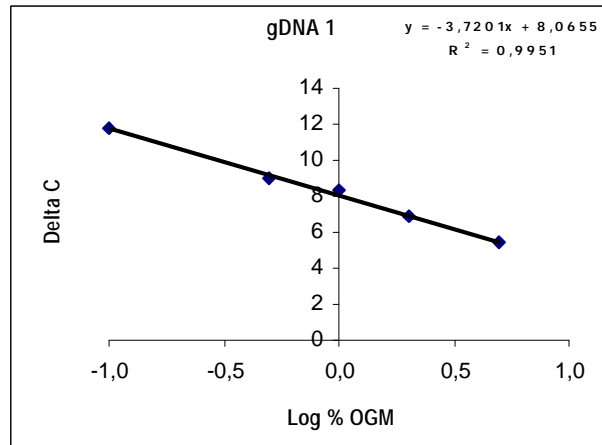


FIGURA 6 – Curvas de calibração para quantificação relativa pelo método do delta Ct. As curvas foram obtidas pela interpolação do logaritmo do percentual de OGM em função dos valores de delta Ct. Cada curva foi gerada em três corridas independentes sob condições de repetibilidade.

quantificação evento específica de canola *LibertyLink* (BLOCK *et al.*, 2003). A influência da variação das eficiências de amplificação entre os alvos p-35S e p-Lec na quantificação de resíduos transgênicos também foi avaliada em etapas posteriores deste trabalho.

Nas curvas pDNA e gDNA, construídas pelo método do delta Ct, somente foi possível determinar a eficiência de amplificação do sistema, uma vez que ambos os alvos contribuem para a elaboração de uma única curva de calibração. Para as curvas obtidas com os pDNA, a eficiência média foi de 78,84% enquanto que para as com gDNA, foi de 81,81%. Este decréscimo na eficiência pode ser explicado pela presença de um alto número de cópias de ambos os plasmídios contidos nos padrões pDNA de %OGM, que podem ter influenciado na eficiência da reação de PCR, comparada quando cada plasmídio foi diluído independentemente. Embora ambos os plasmídios estivessem compondo o padrão de %OGM, cada um deles foi amplificado independentemente em diferentes reações. Deste modo o declínio na eficiência não pode ser atribuída à competição entre a amplificação entre os alvos, mas sim com o *background* das diluições, também conhecido como efeito de matriz. (KURNET *et al.*, 2006). No caso das curvas baseadas em gDNA a menor eficiência pode ser atribuída a menor qualidade do DNA amplificado quando comparado com DNA plasmidial.

Os valores do Y-intercepto permitem a determinação dos valores de Ct ou delta Ct necessários para amplificar uma vez a unidade empregada na obtenção da curva (TAVANIERS *et al.*, 2004). Quando as curvas são construídas plotando-se os números de cópias do alvo em função dos valores de Ct, o valor em que a reta corta o eixo y corresponde ao número de ciclos necessários para que uma cópia do alvo seja amplificada. Teoricamente, considerando uma reação de PCR com 45 ciclos, é assumido que para uma cópia ser detectada sejam necessários 40 ciclos. Caso a curva empregue os valores de delta Ct em função da %OGM, o valor ideal de delta Ct seria de 6,644 para a detecção de uma amostra com 1% de OGM. Uma análise comparativa das três diferentes curvas avaliadas demonstra que as curvas pDNA construídas pelo método da curva padrão apresentam os menores desvios quando comparados aos valores ideais do y-intercepto, e ainda os valores mais elevados de eficiência de amplificação.

TABELA 6 – Análise comparativa entre os principais parâmetros que definem a qualidade das curvas de calibração para quantificação de OGMs. As curvas pDNA e gDNA foram compadas em relação aos valores do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), Y-intercepto, índice de inclinação da reta e eficiência de amplificação por PCR. As curva pDNA foram avaliadas pelo método do delta Ct e da curva padrão, enquanto as gDNA apenas pelo delta Ct. Cada curva foi gerada em três corridas independentes.

Padrões de Calibração	Corrida	Método	$R^2$	Y-Intercepto	Desvio do valor ideal do Y-intercepto (%) *	Índice de Inclinação da reta	Eficiência (%) **
gDNA (0,1%-5%)	1	Delta Ct	0,9951	8,0655	21,39	-3,7201	85,69
	2	Delta Ct	0,9857	8,1808	23,13	-4,2544	71,81
	3	Delta Ct	0,9783	7,3023	9,90	-3,7452	84,93
pDNA (0,01%-100%)	1	Delta Ct	0,9967	8,5208	28,24	-4,1789	73,34
	2	Delta Ct	0,9918	8,1998	23,41	-4,2083	72,83
	3	Delta Ct	0,9987	7,5585	13,76	-3,6173	88,99
pDNA	1	p-35S	0,9888	40,342	0,85	-3,1497	100
		p-Lec	0,9765	40,165	0,41	-3,3602	98,42
	2	p-35S	0,9928	41,189	2,97	-3,3898	97,24
		p-Lec	0,9849	41,319	3,29	-3,4526	94,82
	3	p-35S	0,9886	41,323	3,30	-3,3892	97,26
		p-Lec	0,9882	41,137	2,84	-3,4178	94,64

\* O valor ideal do y-intercepto é 6,644 para as curvas geradas pelo método do delta Ct e 40 para as geradas pelo método da curva padrão;

\*\* Os valores da eficiência foram estimados em função do índice de inclinação da reta ( $E = 10^{-1/\text{índice de inclinação} - 1}$ ).

### **3.3. Determinação da acuracidade e precisão da quantificação de OGMs utilizando curvas de calibração baseadas em pDNA**

Para verificar a acuracidade das curvas de calibração construídas com os plasmídios recombinantes, estas foram utilizadas para a determinação do percentual de resíduos transgênicos presentes nos CRMs, contendo 0,1 a 5,0% de OGMs. Os CRMs foram tratados como amostras com %OGM desconhecidos. Cada padrão foi quantificado em duplicata em três diferentes corridas, tanto pelo método da curva padrão quanto pelo delta Ct. As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados médios de quantificação para cada um dos padrões, pelos métodos do delta Ct e da curva padrão, respectivamente.

Os resultados estimados de %OGM obtidos a partir das curvas pDNA construídas pelo método do delta Ct foram apresentaram elevada acuracidade. Os valores médios de %OGM obtidos para os CRMs contendo 0,1%, 0,5%, 1%, 2% e 5% de soja RR foram 0,13%, 0,53%, 1,30%, 2,45% e 5,35%, respectivamente. Os valores de SD, que variaram apenas de 0,03 a 0,31, e o CV (%) médio de 19,89%, confirmam a precisão das curvas. Os maiores valores de CV (%) foram obtidos para a quantificação dos padrões 0,1% (25,04%) e 0,5% (42,52%). Caso estes padrões fossem excluídos o CV (%) médio decresceria para 10,63%. As maiores variações nos resultados são esperadas para estes padrões, uma vez que a incerteza da medição se eleva a medida que o conteúdo de OGMs decresce nas amostras (PARDIGOL *et al.*, 2003).

O erro médio atingiu o valor extremo de 30,06% para o padrão 1%, o que pode ser considerado elevado para alguns autores, que afirmam que os valores dos desvios com relação à média e com relação aos valores esperados não devem ultrapassar 20% (PUUMALAINEM *et al.*, 2003). No entanto, valores de erro e CV (%) variando de 20% a 35% tem sido descritos com alta frequência para experimentos de quantificação de OGMs que sejam validados apenas intralaboratorialmente (TAVANIERIS *et al.*, 2004; PARDIGOL *et al.*, 2003).

TABELA 7 – Acuracidade e precisão da quantificação dos CRMs pelo emprego de curvas baseadas em pDNA pelo método do delta Ct. As curvas baseadas em pDNA foram utilizadas para quantificação de amostras com %OGM definidos. Cada CRM foi quantificado em duplicata em três corridas independentes. A partir da %OGM obtida para cada um dos CRMs, foram estimados os valores dos erros com relação à %OGM esperada, coeficiente de variação (CV %), desvio padrão (SD) e taxa de recuperação (R%).

CRMs	Corrida	Delta Ct	%OGM	Média	SD	CV (%)	CV (%) Médio	* Erro Médio	** R (%)
0,10%	1	11,82	0,16	0,13	0,03	25,04	19,89	26,79	126,79
	2	12,29	0,10						
	3	10,98	0,12						
0,50%	1	8,97	0,78	0,53	0,22	42,52	5,20	105,20	
	2	9,99	0,37						
	3	8,92	0,43						
1,00%	1	8,31	1,12	1,30	0,22	16,98	30,06	130,06	
	2	7,82	1,23						
	3	6,88	1,55						
2,00%	1	6,91	2,43	2,45	0,31	12,51	22,36	122,36	
	2	6,83	2,15						
	3	5,96	2,76						
5,00%	1	5,44	5,46	5,35	0,13	2,41	7,09	107,09	
	2	5,25	5,21						
	3	4,90	5,39						

\* Erro = (valor obtido – valor esperado / valor esperado) x 100;

\*\* Taxa de recuperação = (média do valor obtido / valor esperado) x 100.

TABELA 8 – Acuracidade e precisão da quantificação dos CRMs pelo emprego de curvas baseadas em pDNA pelo método curva padrão. As curvas baseadas em pDNA foram utilizadas para quantificação de amostras com %OGM definidos. Cada CRM foi quantificado em duplicata em três corridas independentes. A partir dos %OGM obtidos foram estimados os valores dos erros com relação ao valor de %OGM esperados, coeficiente de variação (CV %), desvio padrão (SD) e taxa de recuperação (R%).

CRMs	Corrida	Cópias do p-35S	Cópias do p-Lec	%GMO	Média	SD	CV (%)	CV (%) Médio	* Erro Médio	** R (%)
0,10%	1	1,57	4.467,89	0,04	0,04	0,02	45,40	35,31	57,27	42,73
	2	256,90	911.618,01	0,03						
	3	16,86	26.042,14	0,06						
0,50%	1	3.932,13	967.344,61	0,41	0,27	0,14	50,28		45,63	54,37
	2	2.072,37	1.555.655,18	0,13						
	3	16.085,81	5.832.742,23	0,28						
1,00%	1	12.210,64	1.787.442,21	0,68	0,78	0,26	33,91		21,92	78,08
	2	28.651,75	4.950.020,11	0,58						
	3	7.619,74	705.146,89	1,08						
2,00%	1	7.760,58	446.796,86	1,74	1,62	0,46	28,17		18,78	81,22
	2	28.268,42	2.521.470,12	1,12						
	3	10.557,02	523.812,77	2,02						
5,00%	1	7.760,58	162.961,72	4,76	4,04	0,76	18,77		19,24	80,76
	2	89.422,70	2.751.210,61	3,25						
	3	6.172,90	150.521,88	4,10						

\* Erro = (valor obtido – valor esperado / valor esperado) x 100;

\*\* Taxa de recuperação = (média do valor obtido / valor esperado) x 100.

A quantificação dos CRMs a partir das curvas baseadas no método da curva padrão apresentou acuracidade intermediária. Os valores estimados para os CRMs com 0,1 a 5% de de resíduos transgênicos foram de 0,04%, 0,27%, 0,78%, 1,62% e 4,04%, respectivamente. Os desvios foram comparativamente mais elevados, sendo que o SD variou de 0,02 a 0,76 e o CV (%) médio atingiu o valor de 35,31%. O erro médio foi a medida que apresentou valores mais elevados, atingindo 57,27% para o CRM 0,1% e 45,63 para o CRM 0,5%. Novamente percebe-se a influência dos padrões com baixos percentuais de OGM na acuracidade das curvas. Estes valores, embora elevados, são considerados aceitáveis quando comparados a outros ensaios de validação de sistemas de quantificação de OGMs, que toleraram desvios nos resultados de quantificação de amostras padrões variando de 70% a 79% de erro e 25% a 50% de CV (%) , para padrões de soja e milho GM, respectivamente (ANKLAN *et al.*, 2002; VAN DEN EEDE *et al.*, 2000).

A taxa de recuperação foi também utilizada para verificar a acuracidade das curvas pDNA. Ela é obtida pela razão entre os valores estimados e os esperados e atinge 100% quando os valores estimados são iguais aos esperados ( $x=y$ ). Esta taxa pode ser descrita por uma equação de regressão linear entre os valores esperados e estimados de %OGM (HÄDRICH *et al.*, 1999). A inclinação da reta obtida a partir da regressão indica uma acuracidade satisfatória quando os valores estão entre 0,7-1,2, sendo de 100% quando a inclinação é igual a 1 (BLOCK *et al.*, 2003). Apenas quando a quantificação dos CRMs foi realizada pelo método do delta Ct é que a equação da reta apresentou uma inclinação dentro do intervalo esperado (0,9349). Todos os CRMs quantificados por este método também apresentaram taxas de recuperação próximas a 100%. Pelo método da curva padrão a inclinação foi levemente superior à máxima esperada, atingindo 1,2135, e os valores estimados dos CRMs corresponderam a cerca de 80% dos valores esperados.

A representação gráfica da distribuição das taxas de recuperação obtidas na quantificação de cada um dos padrões, pelos métodos da curva padrão e do delta Ct, pode ser observada na Figura 7. Para comparação, a taxa de recuperação de 100% foi também representada. Estes dados confirmam a maior acuracidade e precisão das curvas pDNA na quantificação dos CRMs quando foi utilizado o método do delta Ct.

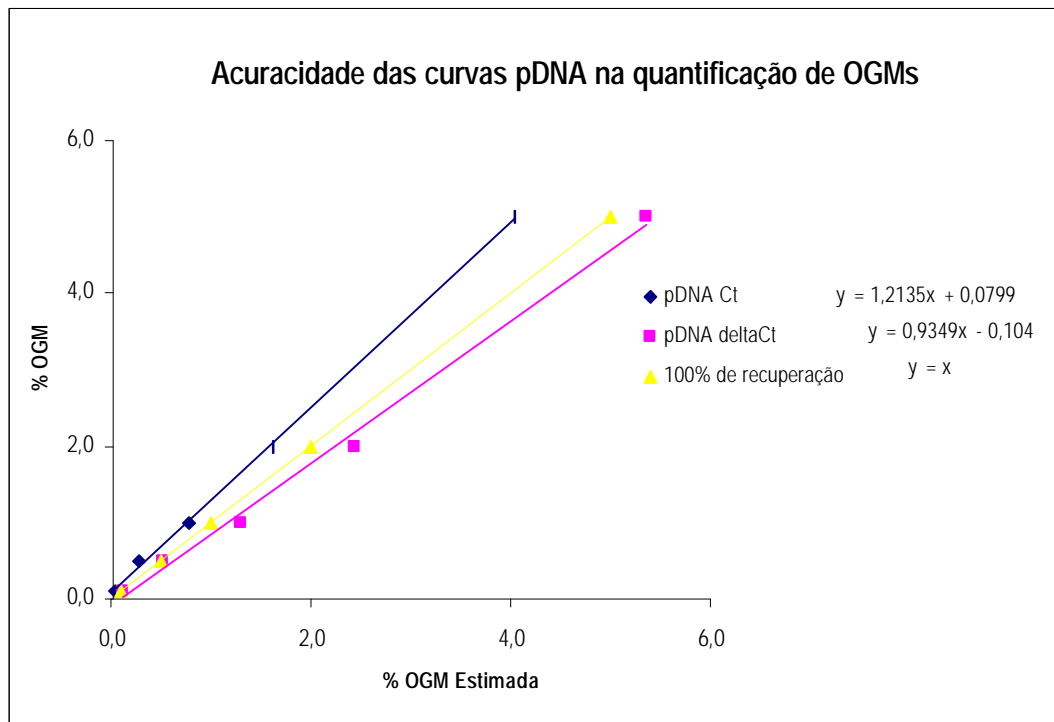


FIGURA 7 – Comparação da acuracidade da quantificação de OGM utilizando curvas pDNA pelo método do delta Ct e da curva padrão. A equação de regressão foi gerada plotando-se os valores de %OGM estimados em função dos observados. A equação que indica 100% de taxa de recuperação é mostrada para comparação.

### 3.5. Determinação do conteúdo de resíduos transgênicos em amostras de alimentos utilizando as curvas de calibração baseadas em pDNA

As curvas de calibração baseadas em pDNA foram avaliadas na quantificação de sete diferentes tipos de amostras: salsicha, empanado, matinais, farinha de trigo, ração, farelo de soja e soja grão. A quantificação do percentual de soja GM nas diferentes amostras foi realizada utilizando-se as curvas de calibração baseadas em pDNA, pelo método do delta Ct e da curva padrão, e em gDNA, pelo método delta Ct, construída com os CRMs. O resultado da determinação do percentual de resíduos transgênicos nas diferentes amostras, utilizando as três diferentes curvas, e os valores de SD e CV (%) correspondentes podem ser observados na Tabela 9.

TABELA 9 – Acuracidade da quantificação da %OGM em amostras de alimentos utilizando as curvas pDNA e gDNA. Cada amostra foi quantificada em três diferentes corridas sob condições de repetibilidade. Foram empregadas as curvas pDNA, baseada no método da curva padrão, e as curvas pDNA e gDNA que utilizaram o método do delta. Os valores médios do % de OGM das amostras e os desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV % ) foram calculados utilizando o total de seis diferentes medidas.

Amostra	Corrida	Delta Ct	gDNA Método do Delta Ct (0,1 - 5%)					pDNA Método do Delta Ct (0,01 - 100%)					pDNA Método da Curva Padrão				
			%OGM	Média	SD	CV (%)	CV (%) Médio	%GMO	Média	SD	CV (%)	CV (%) Médio	%GMO	Média	SD	CV (%)	CV (%) Médio
Salsicha	1	3,98	12,50	11,80	1,03	8,72	18,91	12,17	13,11	0,81	6,17	15,90	11,01	11,01	0,61	5,58	15,73
	2	3,55	12,28					13,56					10,39				
	3	3,46	10,62					13,59					11,62				
Empanado	1	9,84	0,33	0,42	0,17	40,18		0,48	0,48	0,13	26,98		0,14	0,19	0,05	25,22	
	2	9,10	0,61					0,61					0,23				
	3	9,22	0,31					0,35					0,21				
Hidrolisados de soja	1	4,30	10,31	8,45	1,81	21,40		10,25	9,26	0,92	9,96		8,02	6,76	1,11	16,40	
	2	4,26	8,35					9,10					5,93				
	3	4,21	6,70					8,43					6,33				
Ração	1	6,59	2,49	2,45	0,39	16,07		2,89	2,77	0,27	9,80		2,09	1,82	0,24	13,39	
	2	6,26	2,82					2,96					1,61				
	3	6,15	2,04					2,46					1,77				
Farinha de trigo	1	5,22	5,83	4,01	1,62	40,45		6,18	4,39	1,56	35,47		3,86	2,74	0,99	36,11	
	2	5,88	3,48					3,68					1,99				
	3	5,68	2,72					3,32					2,37				
Farelo de soja	1	15,26	0,0119	0,01	0,0025	0,0000		0,02	0,02	0,01	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	
	2	16,11	0,0146					0,01					0,00				
	3	15,02	0,0096					0,01					0,00				
Soja grão	1	1,01	78,95	76,57	4,28	5,59		71,81	94,96	21,76	22,91		125,62	108,82	14,58	13,40	
	2	0,10	79,13					114,99					101,41				
	3	0,35	71,63					98,07					99,44				

Todas as três curvas permitiram uma quantificação de resíduos transgênicos com elevada precisão. No entanto, os menores desvios entre os percentuais de OGM estimados para cada uma das amostras foram observados quando a curva pDNA, baseada no método da curva padrão, foi empregada. Nesta curva, excetuando-se a amostra de soja grão, que apresentou o percentual médio de OGM de 108,92%, e obteve o desvio padrão mais elevado, de 14,58, todas as demais amostras testadas os desvios entre os resultados estimados entre as três repetições não ultrapassaram 1,11. Os menores valores de repetibilidade na quantificação do percentual de resíduos transgênicos também foram observados para a amostra de soja grão quando foram empregadas as curvas baseadas no método do delta Ct. Os desvios atingiram os valores de 21,76 e 4,28, nas curvas pDNA e gDNA, respectivamente. Caso esta amostra fosse desconsiderada, os desvios máximos seriam de 1,56 e 1,81, respectivamente. No entanto, considerando o percentual mínimo aceitável para os desvios dos resultados em torno de 20%, estes valores ainda garantem alta precisão (TAVANIER *et al.*, 2004). No caso das curvas gDNA, onde os padrões variam apenas de 0,1 a 5,0% de OGM, este resultado é esperado, uma vez que valores de %OGM acima de 5,0% extrapolam o intervalo de confiança da curva. Nas curvas pDNA esta variação pode ser atribuída à falta de precisão dos padrões pDNA que apresentavam elevado número de cópias. A variação entre as eficiências de amplificação dos padrões p-Lec e p-35S, estimados a partir do índice de inclinação das curvas obtidas, pode ter tido maior influência na quantificação de amostras que apresentavam alto número de cópias do alvo, nas quais grande parte do DNA da espécie analisada é GM.

A alta precisão das curvas pode ser também observada a partir dos valores de CV (%) médio, que foi menor nas curvas pDNA que utilizaram o método da curva padrão, com cerca de 15,73%, e de 15,90% e 18,91% para as curvas pDNA e gDNA, que utilizaram o método do delta Ct, respectivamente. Mesmo para as amostras que apresentaram menores percentuais de resíduos de soja GM em sua composição, como as de farelo de soja ou empandado, ou mesmo baixos percentuais de soja na composição do produto, como as de matinais e farinha de trigo, os valores estimados da %OGM foram estáveis nas diferentes repetições. Deste modo pode-se concluir que as curvas baseadas em pDNA foram capazes de estimar o percentual de resíduos transgênicos com níveis de repetibilidade similares quando comparadas com as baseadas em gDNA. Tal fato, no entanto, não pode

garantir a certeza dos resultados, uma vez que o percentual das amostras é desconhecido e as amostras CRMs não estão sendo assumidas como apresentando 100% de acuracidade. Isto decorre do grande número de variáveis inerentes no processo de obtenção dos padrões baseados em gDNA.

A comparação dos valores percentuais de resíduos transgênicos das amostras entre as curvas pDNA com a curva gDNA, revela uma maior similaridade entre os resultados obtidos pelas curvas pDNA e gDNA, quando o mesmo método de quantificação foi utilizado, o delta Ct. A alta similaridade entre as curvas que empregaram o método do delta Ct tornou os desvios dos resultados de %OGM das amostras menores entre estas diferentes curvas, quando comparados com os desvios estimados dentro de cada uma destas curvas. Excetuando-se a amostra de soja grão, os desvios obtidos entre estas duas curvas, variaram apenas de 0,002 a 0,93, com o CV (%) não ultrapassando 7,7%, enquanto dentro de cada uma das curvas, pDNA e gDNA, os desvios variaram de 0,01 a 1,56 e de 0,002 a 1,81, respectivamente. Os valores de CV (%) médio também foram mais elevados, superiores a 15% para ambas as curvas. Em contrapartida, quando os valores de quantificação das amostras entre as curvas pDNA e gDNA, utilizaram diferentes métodos de quantificação, o da curva padrão ou o do delta Ct, os valores de desvios obtidos variaram de 0,01 a 1,19, sendo que o desvio em relação à média dos resultados obtidos atingiu o valor mais elevado de 20,78%. Este valor foi até mesmo superior ao de 18,18%, obtido quando as três diferentes curvas foram comparadas. As comparações nos resultados de quantificação obtidos entre cada curva pDNA com a curva gDNA, bem como entre as três diferentes curvas, podem ser observadas as Tabelas 10, 11 e 12, respectivamente

Embora os padrões utilizados para a construção das curvas pDNA e gDNA apresentem diferentes origens, a presença de ambos os alvos na composição de cada padrão de %OGM parece ter levado à maior similaridade nos resultados estimados de delta Ct. Nas curvas pDNA, baseadas no método do delta Ct, os plasmídios p-35S e p-Lec foram misturados em proporções específicas para a obtenção dos padrões de %OGM. Embora cada alvo tenha sido amplificado independentemente, em reações simples, o *background* parece ter influenciado na eficiência e, conseqüentemente, na quantificação dos padrões. Estes padrões, embora constituídos de DNA plasmidial, apresentaram maior semelhança aos baseados em gDNA e às amostras a serem quantificadas, onde ambos os alvos

estão presentes. Deste modo, embora os padrões baseados em pDNA sejam mais puros e apresentem maiores potencialidades em termos de precisão e qualidade das curvas obtidas, isto pode acarretar uma grande dissimilaridade com as amostras de interesse a serem quantificadas. Tal fato foi demonstrado pela menor acuracidade destes padrões na quantificação dos CRMs e das amostras de alimentos.

TABELA 10 – Acuracidade da quantificação da %OGM entre as curvas pDNA e gDNA. A %OGM das diferentes amostras foram comparadas entre curvas pDNA e gDNA, ambas baseadas no método do delta Ct. Os valores de desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV % ) foram calculados entre as médias dos valores de %OGM obtidas em cada curva.

Amostra	gDNA Método do Delta Ct (0,1 – 5%)	pDNA Método do Delta Ct (0,01 - 100%)	Média	SD Entre Métodos	CV (%) Entre os Métodos	CV (%) Médio Entre os Métodos
Salsicha	11,80	13,11	12,46	0,93	7,44	7,67
Empanado	0,42	0,48	0,45	0,04	9,41	
Matinais	8,45	9,26	8,86	0,58	6,50	
Ração	2,45	2,77	2,61	0,23	8,76	
Farinha de trigo	4,01	4,39	4,20	0,27	6,40	
Farelo de soja	0,00	0,02	0,01	0,002	0,00	
Soja grão	76,57	94,96	85,77	13,00	15,16	

TABELA 11 – Acuracidade da quantificação da %OGM entre as curvas pDNA e gDNA. A %OGM das diferentes amostras foram comparadas entre curvas de calibração utilizadas. Foram empregadas as curvas pDNA, baseada no método da curva padrão, e a curva gDNA que o método do delta Ct foi utilizado. Os valores de desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV %) foram calculados entre as médias dos valores de %OGM obtidas em cada método.

Amostra	gDNA Método do Delta Ct (0,1 – 5%)	pDNA Método da Curva Padrão	Média	SD Entre Métodos	CV (%) Entre os Métodos	CV (%) Médio Entre os Métodos
Salsicha	11,80	11,01	11,40	0,56	4,90	20,78
Empanado	0,42	0,19	0,31	0,16	52,92	
Hidrolisados de soja	8,45	6,76	7,61	1,19	15,71	
Ração	2,45	1,82	2,14	0,44	20,68	
Farinha de trigo	4,01	2,74	3,37	0,90	26,65	
Farelo de soja	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	
Soja grão	76,57	108,82	92,70	22,81	24,60	

TABELA 12 – Acuracidade da quantificação da %OGM entre as curvas pDNA e gDNA. A %OGM das diferentes amostras foram comparadas entre curvas de calibração utilizadas. Foram empregadas as curvas pDNA, baseada no método da curva padrão, e as curvas pDNA e gDNA que utilizaram o método do delta. Os valores de desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV % ) foram calculados entre as médias dos valores de %OGM obtidas em cada método.

Amostra	gDNA Método do Delta Ct (0,1 – 5%)	pDNA Método do Delta Ct (0,01 - 100%)	pDNA Método da Curva Padrão	Média	SD Entre Métodos	CV (%) Entre os Métodos	CV (%) Médio Entre os Métodos
Salsicha	11,80	13,11	11,01	11,97	1,06	8,86	18,18
Empanado	0,42	0,48	0,19	0,36	0,15	41,70	
Hidrolisados de soja	8,45	9,26	6,76	8,16	1,28	15,65	
Ração	2,45	2,77	1,82	2,35	0,48	20,46	
Farinha de trigo	4,01	4,39	2,74	3,71	0,87	23,30	
Farelo de soja	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00	
Soja grão	76,57	94,96	108,82	93,45	16,18	17,31	

#### 4. DISCUSSÃO

Dois tipos de padrões vêm sendo utilizados na quantificação relativa de resíduos transgênicos, os baseados em gDNA, também conhecidos como CRMs, e os baseados em pDNA (ALARY *et al.*, 2002; HIRD *et al.*, 2003; TERRY *et al.*, 2001; TOYOTA *et al.*, 2006).

Os CRMs atualmente disponíveis variam apenas de 0,1% a 5,0% de OGM e são produzidos pela equivalência em massa de farinha de grãos GM e não GM, enquanto que na amplificação por PCR a equivalência da %OGM é dada em termos de número de moléculas de DNA amplificadas. A extrapolação da equivalência do número de moléculas de DNA para massa não é exata, uma vez que o número de moléculas de DNA em uma unidade de material GM pode ser diferente da quantidade de DNA em uma unidade de material não GM. Tal fato tem levado a validação de métodos de quantificação de OGM baseados no número de cópias de moléculas de DNA. As moléculas de DNA plasmidial, contendo os fragmentos transgênicos e endógenos clonados, se tornaram grandes candidatos para a obtenção de padrões baseados em número de cópias para quantificação de OGM (BLOCK *et al.*, 2003; TERRY *et al.*, 2001; HERNANDEZ *et al.*, 2003). Estas moléculas apresentam, dentre outras características que favorecem seu uso no lugar dos padrões baseados em gDNA, fácil manipulação, DNA de boa qualidade e estabilidade, baixo custo quando comparadas aos CRMs, ampla faixa de trabalho (0,01% a 100%) e não necessitam de etapas exaustivas de homogeneização para

serem produzidas, que podem levar a severa degradação do DNA. Os padrões baseados em DNA plasmidial também independem de variações comumente encontradas nos padrões gDNA, como por exemplo, níveis de heterozigosidade, variedades dos grãos, quantidade de DNA por massa dos grãos GM com relação ao não GM.

No presente trabalho os fragmentos de DNA correspondentes a partes da região promotora 35S e do gene da lectina de soja foram clonados e utilizados para a produção de padrões de OGM. Estes padrões baseados em pDNA foram utilizados para a construção de curvas de calibração para quantificação de OGM pelo método da curva padrão e delta Ct. Baseados nos resultados obtidos, ambas as curvas construídas com pDNA, que empregam os métodos da curva padrão ou do delta Ct, foram capazes de quantificar com precisão amostras com percentuais de OGM definidos. No entanto, quando foi empregado o método do delta Ct, a acuracidade da quantificação dos CRMs foi mais elevada em todos os parâmetros avaliados. Uma explicação para a menor acuracidade das curvas baseadas no método da curva padrão se refere à forma de preparo dos padrões. Neste método, cada uma das curvas p-Lec e p-35S foram construídas independentemente e não houve mistura dos plasmídios, levando a uma alta eficiência de ambos os alvos amplificados. Em contrapartida, nas curvas baseadas no método do delta Ct, os plasmídios p-35S e p-Lec foram misturados em proporções específicas para a obtenção dos padrões de %OGM. Embora cada alvo tenha sido amplificado independentemente, em reações simples, o *background* parece ter influenciado na eficiência e, conseqüentemente, na quantificação dos padrões. Estes padrões apresentam maior semelhança aos baseados em gDNA, onde ambos os alvos estão presentes, no entanto, isto não garante a precisão dos resultados.

A interferência na sensibilidade do PCR quantitativo, e, conseqüentemente, variações nos resultados de quantificação, devido ao efeito de matriz ou do *background* das diluições de padrões baseados em pDNA, tem sido descritas principalmente quando é empregada a metodologia SYBR green (KUNERT *et al.*, 2006). No presente trabalho alterações na sensibilidade podem ser observadas pela variação entre as eficiências de amplificação dos plasmídeos p-Lec e p-35S. Quando cada padrão continha apenas um dos plasmídios, nas curvas pDNA baseadas no método da curva padrão, os valores médios de eficiência de amplificação das curvas p-35S e p-Lec foram de 100% e 96,38%, respectivamente. No entanto, quando

ambos os plasmídios foram misturados para a obtenção dos padrões utilizados para quantificação pelo método do delta Ct, os valores médios de eficiência não ultrapassaram a 80%.

Deste modo, embora os padrões baseados em pDNA sejam mais puros e apresentem maiores potencialidades em termos de precisão, isto pode acarretar uma grande dissimilaridade com as amostras de interesse a serem quantificadas, como as de alimentos e grãos. Tal pressuposição também foi confirmada a partir dos resultados de quantificação das amostras de alimentos. Os valores estimados de resíduos transgênicos nas amostras avaliadas foram significativamente mais similares quando empregadas as curvas pDNA e gDNA, pelo método do delta Ct, comparados com aqueles obtidos nas curvas pDNA pelo método da curva padrão.

Uma alternativa para a obtenção de padrões pDNA mais similares às amostras de interesse seria a diluição dos padrões pDNA em DNA genômico da espécie selvagem em questão, em lugar de água. Esta estratégia foi empregada por BLOCK *et al.* (2003), e resultou em padrões pDNA altamente precisos na quantificação dos CRMs. Com a legislação de rotulagem vigente, a demanda de quantificação de resíduos transgênicos em diferentes tipos de produtos, compostos por diferentes tipos de matrizes e níveis de processamento, o emprego dos padrões baseados em pDNA oferece a alternativa para a obtenção de padrões pDNA específicos para cada tipo de produto. As amostras de DNA plasmidial podem ser facilmente diluídas nas mais diferentes matrizes de alimentos, como produtos cárneos, ração, bebidas lácteas, entre outras, desde que se tenha a matriz não GM do produto em questão.

Devido à alta acuracidade demonstrada pelos padrões pDNA, principalmente quando empregado o método do delta Ct, uma etapa complementar da validação deste sistema para a quantificação de resíduos GM em alimentos, seria a submissão deste padrões a testes interlaboratoriais, também conhecidos como testes de proficiência. Estes testes são imprescindíveis se o sistema for submetido à apreciação de órgãos de padronização internacionais, no caso de análises em alimentos, o *Codex Alimentarius*.

A organização e participação de testes de proficiência para quantificação de resíduos transgênicos ainda é pouco freqüente no Brasil, bem como a existência de laboratórios com capacidade técnica para o desenvolvimento de metodologias alternativas. Os testes interlaboratoriais mais comuns são desenvolvidos por

organizações internacionais e se atêm a metodologias que empregam kits comerciais e apenas CRMs.

## 5. CONCLUSÕES

- As curvas de calibração construídas a partir de DNA plasmidial, obtidas tanto com os plasmídios sozinhos (método da curva padrão) quanto em uma mistura (delta Ct), apresentaram níveis de repetibilidade similares quando foram empregados os CRMs. No entanto, Os menores valores de SD e %CV foram estimados para as curvas baseadas em pDNA, quando utilizada a metodologia da curva padrão.
- A avaliação da qualidade das curvas quanto inclinação da reta, y-intercepto e eficiência de amplificação foram superiores para as curvas pDNA obtidas pelo método da curva padrão.
- A acuracidade das curvas pDNA pelo método da curva padrão na quantificação dos CRMs foi intermediária. O Erro médio para CRM 0,1% foi de 57,27. No entanto pelo método do delta Ct a acuracidade foi elevada, conforme confirmado pelos valores de SD, %CV, Erro e %R.
- A %OGM das amostras de alimentos não apresentou variação significativa entre as diferentes curvas utilizadas, concluindo-se que as curvas pDNA são tão precisas quanto as baseadas em gDNA para a quantificação de resíduos transgênicos em alimentos. No entanto, houve uma maior similaridade dos resultados quando foi empregado o mesmo método de quantificação, o delta Ct.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARY, R.; SERIN, A.; MAURY, D.; JOUIRA, H. B.; SIRVEN, J. P.; GAUTIER, M. F.; JOUNDRIER, P. (2002). *Food Control* 13:235-244.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acid. Res.**, **25**:3389-3402, 1997
- ANKLAN, E. HEINZE, P.; VAN DEN EDEE, G.; PÖPING, B; (2002). *J AOAC Int* 85:809-815.
- APPLIED BIOSYSTEMS. (2003). Creating standards curves with genomic DNA or plasmids DNA templates for use in quantitative PCR. *Tutorial Review*. 9 p.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, K. S. (1998). *Currents Protocols in Molecular Biology in CD-ROM*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- BERDAL, K. G.; HOLST-JENSEN, A. (2001). Roundup Ready<sup>®</sup> soybean event-specific real time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analysis. *Eur. Food. Res. Technol* 213:432-438.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. Manual de transformação genética de plantas. Ed Embrapa-SI Cenargem. Brasil. 1998. 309 p.
- BLOCK, A.; SCHWARZ, G. (2003). Validation of different genomic and cloned DNA calibration standards for construct-specific quantification of LibertyLink in rapeseed by real time PCR. *Eur. Food Res. Technol.* 216:421-427.
- DAHINDEN, I.; ZIMMERMANN, A.; LINIGER, M.; PAULI, U. (2002) Processing. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill F (eds) Rapid cycle real-time PCR – methods and applications, microbiology and food analysis (pp 251-258). Berlin: Springer.

- GINZINGER, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30: 503-512.
- HÄDRICH J.; VOGELSANG, J. (1999). Ein statistischer ansatz für die praxis, Teil 1: Nachweisgrenze, Erfassungs-grenze und bestimmungsgrenze. *Dtsch Lebensm Rundsch* 95:428-436.
- HERNANDEZ, M.; RÍO, A.; ESTEVE, T.; PRAT S.; PLA, M. 2001. A Rapeseed-Specific Gene, Acetyl-CoA Carboxylase, Can Be Used as a Reference for Qualitative and Real-Time Quantitative PCR Detection of Transgenes from Mixed Food Samples. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3622-3627.
- HIRD, H.; POWELL, J. JOHNSON, M. L.; OEHLISCHLAGER, S. (2003). *J AOAC Int* 86:66-71.
- HOLCK, A.; VAITILINGOM, M.; DIDIERJEAN, L. ; RUDI, K. (2002). 5´ nuclease PCR for quantitative event specific detection of genetically modified Mon810 MaisGard™ maize. *Eur. Food Res. Technol.* 214:449-453.
- HOLST-JENSEN, A.; RONNING, S. B.; LOVESETH, A.; BERDAL, K. G. (2003). *Anal Bioanal Chem.* 375:985-993.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28, 1990.
- KURNET, R.; GACH, J. S.; VORAUER-UHL, K.; ENGEL, E. ; KATINGER, H. (2006). Validated method for quantification of genetically modified organisms in samples of maize flour. *J. Agric. Food Chem.* 34: 678-681.
- LIVAK, K. J. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-Ct}$  Method. *Methods* 25:402-408.

- MEYER, R., CANDRIAN, U. ; LUÈ THY, J. (1994). Detection of Pork in Heated Meat products by Polymerase Chain Reaction (PCR). *JAOAC Int.* 77: 617-622.
- PARDIGOL, A.; GUILLET, S.; PÖPPING, B. (2003). A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. *Eur Food Res Technol*, 216, 412-420.
- PUUMALAINEN, J.; PAOLETTI, C.; BERTHEAU, Y.; BONNER, P.; BROLL, H.; DAMANT, A.; DE SANTIS, B.; HOLST-JENSEN, A.; LAURENSSE, E.; MONSTED, M.; ONORI, R.; STEPHENSEN, P.; TAVANIERS, I.; TRAPMANN, S.; VAN DEN EDEE, G. (2003) Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing, ENGL WG Validation, Version1.7.2003.
- ROGERS, S. O.; BENEDICH, A. J. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Man.* A6:1-10.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.
- TAVERNIERS, I.; WINDELS, P.; BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. (2001). Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. *Eur Food Res Technol*, 213:417-424.
- TAVERNIERS, I.; BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. (2004). Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. *Anal Bioanal Chem.* 378, 1198-1207.
- TERRY, C. F.; HARRIS, N. (2001). Event specific detection of Roundup Ready soya using two different real time PCR detection chemistries. *Eur. Food. Res. Technol.* 213:425-431.
- TOYOTA, A.; AKIYAMA, H.; SUGIMURA, M.; WATANABE, T.; KIKUCHI, H.; KANAMORI, H.; HINO, A.; ESAKA, M.; MAITANI, T. (2006). Quantification of

genetically modified soybeans using a combination of a capillary-type real time PCR system and a plasmid reference standard. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:821-827.

TERZI, V.; FARRARI, B.; FINOCHIARO, F.; De FONZE, N.; STANCA, A. M.; LAMACCHIA, C.; NAPIER, J.; SHEWRY, A. R.; FACCIOLI, P. (2003). *J. Cereal Sci.* 37:157-163.

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

VAITILINGOM, M.; PIJNENBURG, H.; GENDRE, F.; BRIGNON, P. (1999). Real time of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 5261-5266.

VAN DEN EDEE, G.; LIPP, M. EYQUEM, F.; ANKLAN, E. (2000). Validation of analytical methods for the detection of GMO-derived DNA in processed foodstuffs. *Report from the EC-JRC*, Ispra, Italy.

ZEITLER, R.; PIETSCH, K.; WAIBLINGER, H. U. (2002). *Eur. Food. Res. Technol.* 214:346-351.

ZIMMERMANN, A. LUTHY, J.; PAULI, U. (2000). Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 33: 210-216.

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