

Comparação de métodos de extração de DNA e detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos processados derivados de milho

Aline Gomes de Souza, Patrícia Terra Alves, Carlos Ueira Viera, Vivian Alonso Goulart

Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG (Brasil).
alingosouza@yahoo.com.br

RESUMO: Diante dos avanços biotecnológicos o cultivo de plantas geneticamente modificadas, como, por exemplo, o milho (*Zea mays*), aumentou consideravelmente nos últimos anos. Embora esta tecnologia apresente comprovados benefícios em relação ao aumento da produtividade e durabilidade do alimento, a população ainda receia em consumir produtos geneticamente modificados. O objetivo deste trabalho foi comparar dois protocolos baseados na utilização de CTAB e avaliar qual o melhor para extração de DNA em alimentos processados derivados de milho, bem como identificar dois dos resíduos transgênicos mais comuns em gêneros alimentícios derivados de milho: Cry1ab e Cry1F. Para isto, 14 amostras derivadas de milho foram avaliadas utilizando dois diferentes protocolos de extração de DNA e a detecção dos eventos transgênicos conduzida pela técnica de PCR qualitativa. Entre as amostras analisadas, 57% resultaram positivas para detecção de ambos os eventos de milho transgênico avaliados.

Palavras-chave: resíduos de transgênicos, legislação, milho geneticamente modificado, PCR.

Evaluation of DNA extraction methods and detection of genetically modified organisms in processed foods derived from corn

ABSTRACT: Given the advances in biotechnology cultivation of genetically modified crops, for example, maize (*Zea mays*) plants increased considerably in recent years. Although such technology presents proven benefits in relation to increased productivity and durability of food, the population still fears to consume genetically modified products. The objective of this study was to compare two protocols based on the use of CTAB and evaluate which is best for extraction of DNA in processed food derived from maize. As well as identifying two of the most common transgenic residues in foodstuffs derived from maize: Cry1Ab and Cry1F. Para this, 14 samples derived from maize were evaluated using two different protocols for DNA extraction and detection of transgenic events conducted by qualitative PCR. Among the samples, 57% resulted positive for detection of both transgenic corn event evaluated.

Keywords: transgenic residues, legislation, genetically modified maize, PCR.

Introdução

Na indústria alimentícia, o uso de organismos geneticamente modificados (OGMs) tem possibilitado o desenvolvimento de cultivos mais resistentes a pragas, doenças e com maior produtividade, além da melhoria das características nutricionais do alimento pronto para consumo¹.

No Brasil, o cultivo do milho transgênico foi permitido a partir de 2007². No entanto, parte da população acredita que o consumo de alimentos produzidos a partir de matéria prima transgênica possa causar algum tipo de dano à saúde, como problemas alérgicos e intoxicações. Assim,

diante dos benefícios e potenciais riscos relacionados com o consumo dos transgênicos há controvérsias sobre sua seguridade, tendo o consumidor o direito de decidir sobre o seu consumo³.

Desta forma, no Brasil, desde 2003, alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal, constituídos ou produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, com presença acima de 1%, devem ser obrigatoriamente rotulados⁴.

Assim, para uma análise confiável do produto, o método deve incluir as etapas de detecção, identificação e quanti-

ficação do OGM presente. Por isso, é necessária uma avaliação segura do protocolo escolhido para a extração e quantificação do material, a fim de verificar a necessidade da rotulagem no produto, conforme recomenda a legislação de cada país⁷.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido uma ferramenta confiável tanto para detectar, quanto para quantificar a presença de OGM, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade na detecção do material transgênico mesmo que este esteja contido em baixa porcentagem no alimento⁵. No entanto, existem interferentes que podem comprometer a análise como, por exemplo, o nível de processamento do produto, contaminantes oriundos dos processos de extração do material genético e o excesso de proteínas e polissacarídeos⁶.

Entre os cultivos de milho transgênico destacam-se os eventos TC1507 e Bt11, cujos genes inseridos são provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Tais genes codificam a proteína Cry responsável pela ação inseticida e resistência destes cultivos a insetos da ordem lepidóptera, sendo as variantes desta proteína Cry1a e Cry1F expressas principalmente em eventos de milho Bt11⁸ e milho TC1507⁹.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar dois protocolos para extração do material genético em produtos processados, bem como detectar a presença de resíduos transgênicos nos mesmos, fazendo da PCR uma técnica útil para o monitoramento de transgênicos em alimento. Diante da forte tendência de que novas variedades provenientes da biotecnologia cheguem ao mercado consumidor, é indispensável à existência de métodos validados para extrair o material genético detectar e identificar os eventos transgênicos entre os mais diversos tipos de alimentos, conforme determina a legislação.

Materiais e métodos

Amostras

Neste estudo foram analisados 14 ingredientes alimentares contendo milho: amido de milho, creme de milho, fubá de milho, farinha de milho, milho em grão e mistura para bolo de dois diferentes sabores (milho e fubá), tendo duas amostras de diferentes marcas para cada tipo de produto, as quais não apresentavam nenhum tipo de informação quanto à presença de organismos geneticamente modificados e sendo todas as amostras adquiridas nos supermercados da cidade de Uberlândia, Minas Gerais - Brasil.

Extração do DNA

O DNA foi extraído em duplicata usando dois diferentes protocolos modificados baseados no método CTAB – *cetyltrimethylammoniumbromide*¹⁰⁻¹¹ e a concentração do DNA obtido foi estimada pelo espectrofotômetro (NANODROP Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). A qualidade e pureza do DNA extraído foram verificadas pela razão de absorvância 260/280 nm.

Protocolo 1

Cem miligramas das amostras foram misturadas com 1100 µL de tampão de extração CTAB (20 g L⁻¹ CTAB; 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA) 0,1 mg mL⁻¹ proteinase K e 0,2% β- mercaptoetanol. Incubou-se a 64° C por 30 minutos e depois adicionou-se 40 µL mL⁻¹ de Rnase, deixando incubado por mais 10 minutos. Posteriormente adicionou-se 800 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se a 13000 x g por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e misturada com 350 µL do tampão de extração e 650 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), repetindo esta etapa por duas vezes. O DNA foi precipitado com 400 µL de isopropanol gelado e em seguida centrifugado por 13000 x g por 5min. Depois, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70% e seco a temperatura ambiente, sendo posteriormente diluído em 40 µL de água MiliQ¹⁰.

Protocolo 2

Cem miligramas das amostras foram adicionadas a 700 µL de tampão CTAB (20 g L⁻¹ CTAB; 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA). Incubou-se em banho-maria a 65° C por 30 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. Ao homogeneizado foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitando-se por cinco minutos; em seguida, centrifugado a 5000 x g por 10 minutos. Em novos tubos identificados transferiu-se a fase aquosa, na qual foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado, misturando por inversão dos tubos várias vezes. As amostras foram então submetidas à temperatura de -20° C por 30 minutos para formação do *pellet*. Centrifugaram-se as amostras por 20 minutos a 12000 x g e foi descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% por 5 minutos e uma vez com etanol absoluto, por 3 minutos. Secou-se o precipitado a temperatura ambiente. O DNA extraído foi ressuspendido em 40 µL de água MiliQ¹¹.

PCR qualitativa

A reação de amplificação foi padronizada com um volume total de 25 µL contendo 100 ng de DNA, 1 x PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 5 µM de cada *primer*; 0,4 mM de cada dNTP, 1 unidade de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen, USA).

As reações foram conduzidas em um termociclador (MJ Reseach) usando o seguinte programa: para desnaturação inicial 94° C por 4 min, 35 ciclos de 30 seg a 94° C, 1 min a 59° C e 2 min a 72° C e uma extensão final de 72° C por 7 min. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídeo. Os *primers* empregados para detecção do material transgênico, os controles positivos e negativos foram sintetizados pela Sigma-Aldrich (cf. Tabela 1). O tamanho dos fragmentos gerados para cada *primer* está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Características dos *primers* utilizados para detectar o gene constitutivo (*Zea mays*) e os genes transgênicos (Cry1a e Cry1F) alimentos por PCR

Nome	Especificidade	Sequência	Tamanho produto de PCR (bp)	Referência
ZEO1 ZEO2	Gene delta Zeína	AGT GCG ACC CAT ATT CCA G GAC ATT GTG GCA TCA TTT	277	11
Cry1aF Cry1a R	Gene Cry1a	GGA CAA CAA CCC AAA CAT CAA GCA CGA ACT CGC TGA GCA G	152	2
MAIY1 MAIY 2	Gene Cry1F	TAG TCT TCG GCC AGA ATG G CTT TGC CAA GAT ACC GCG	58	12

O controlo positivo utilizado para a análise da reação de PCR dos primers Cry1a e Cry1F trata-se de uma amostra de milho positiva para ambos os eventos de transgenia (*Bt11* e *TC1507*), sendo o controlo negativo também uma amostra de milho, mas isenta de transgenes (milho 0% OGM). Entretanto, o controlo negativo empregado para a reação de PCR com o primer ZEO uma amostra de soja, a fim de garantir a especificidade do gene em amostras de milho.

Resultados e discussão

Extração do DNA

O rendimento do DNA obtido a partir de 100mg das amostras analisadas está representado na Figura 1A.

O valor do rendimento do DNA foi calculado avaliando a média de três leituras a 260 nm de cada uma das duplicatas, bem como a média de todas as réplicas em cada tipo de amostra, como descrito em estudos anteriores¹⁴.

Embora ambos os protocolos avaliados utilizem o detergente CTAB, os processos posteriores, bem como os reagentes empregados em cada um, distingue a eficiência entre eles. O maior rendimento foi obtido a partir do protocolo 1. Entre as amostras, o milho em grão obteve o maior rendimento em DNA quantificável: 267,6 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ e 192,2 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ nos protocolos 1 e 2, respectivamente.

Em contrapartida, o amido de milho foi, em ambos os protocolos, o que obteve o menor rendimento, tendo aproximadamente de 7,8 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ no protocolo 1 e 3,8 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ no protocolo 2.

Assim, alimentos que são submetidos a altos níveis de processamento obtiveram baixo rendimento na quantidade de DNA extraído. O amido de milho, por exemplo, apresentou o menor rendimento e qualidade em ambos os protocolos. Já o milho em grão, por ser um alimento minimamente processado, alcançou um alto rendimento se comparado com as demais amostras.

A razão de $\text{Abs}_{260/280}$ também foi calculada para estimar a qualidade do DNA extraído pelos diferentes protocolos

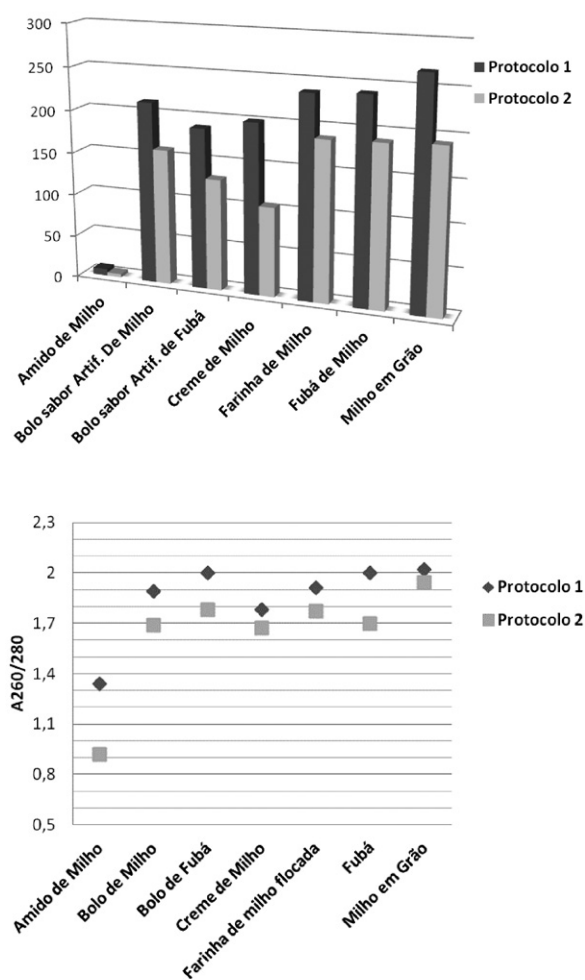


Figura 1: Análise do rendimento e pureza do DNA extraído por ambos os protocolos. A) Rendimento de DNA obtido das amostras alimentares derivadas de milho em $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ por 100 mg de amostra pelos dois diferentes protocolos. B) Qualidade do DNA extraído pelos dois protocolos analisados utilizando a leitura em absorbância de 260 e 280nm.

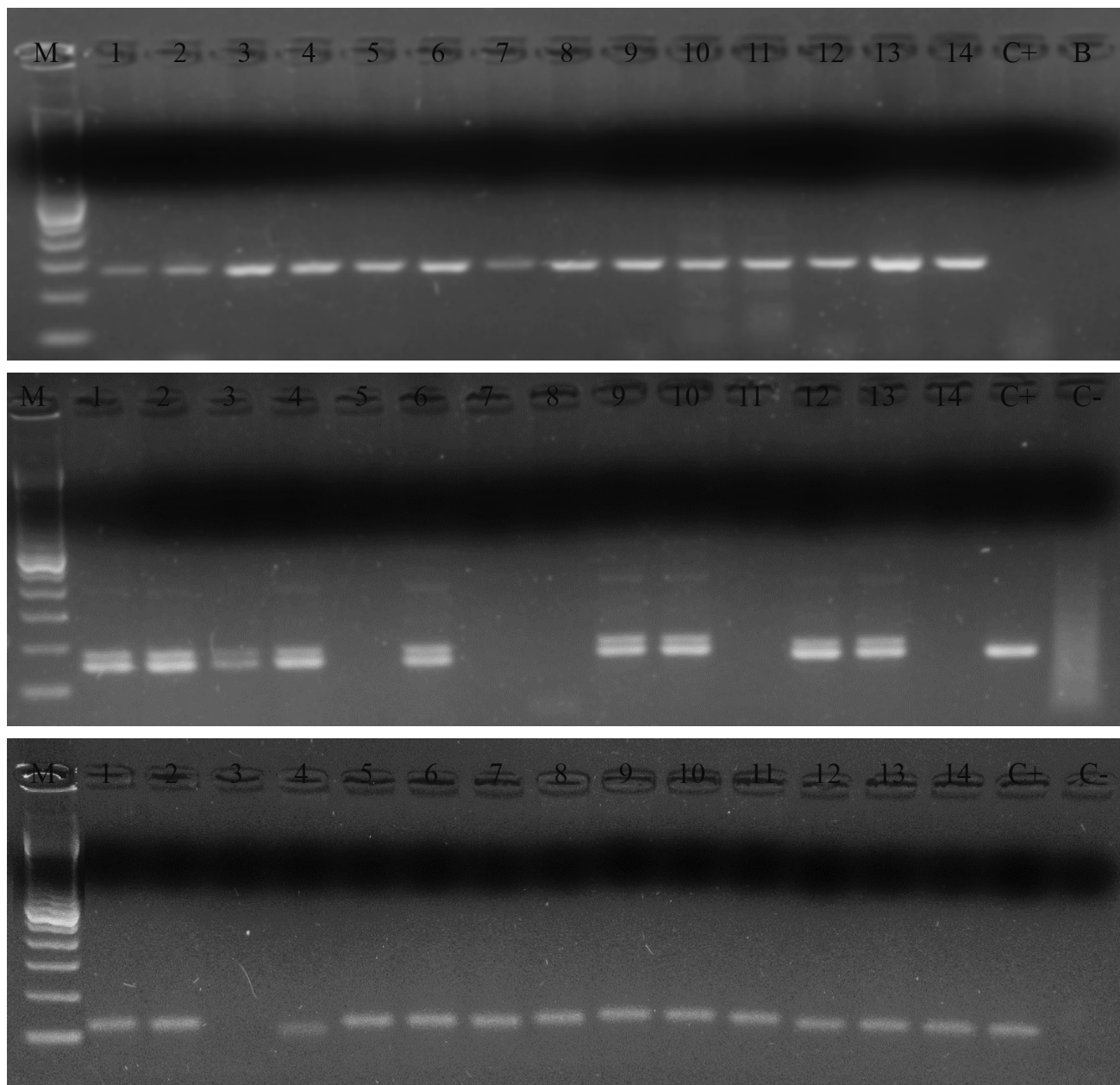


Figura 2: Análise em gel de agarose 2% dos fragmentos amplificados para os *primers* Zeo, Cry1a e MAIY. A) Detecção do DNA de milho amplificado por PCR usando o *primer* ZEO1/ZEO2 (gene constitutivo do milho). M: marcador molecular 100 pb, 1-2: Creme de milho, 3-4: Bolo sabor artif. de milho, 5-6: Bolo sabor artif. de fubá, 7-8: Amido de milho, 9-10: Farinha de milho, 11-12: Fubá, 13-14: Milho em grão, C- controle negativo (DNA de Soja), B: Branco (reação sem o DNA *template*). B) Detecção de milho geneticamente modificado por PCR em produtos alimentares derivadas de milho com o *primer* Cry1aF/Cry1aR (gene específico de milho transgênico Bt11). M: marcador molecular 100 pb, 1-2: Creme de milho, 3-4: Bolo sabor artif. de milho, 5-6: Bolo sabor artif. de fubá, 7-8: Amido de milho, 9-10: Fubá, 11-12: Farinha de milho, 13-14: Milho em grão, C+: Controle Positivo (milho transgênico), C-: Controle negativo amostra de milho 0% transgênica. C) Detecção de milho geneticamente modificado por PCR em produtos alimentares derivadas de milho com o *primer* MAIY1/MAIY2 (gene específico de milho transgênico TC1507). M: marcador molecular 100 pb, 1-2: Creme de milho, 3-4: Bolo sabor artif. de milho, 5-6: Bolo sabor artif. de fubá, 7-8: Amido de milho, 9-10: Fubá, 11-12: Farinha de milho, 13-14: Milho em grão, C+: Controle Positivo (milho transgênico), C-: Controle negativo amostra 0% transgênica.

(cf. Figura 2B). As proporções da $Abs_{260/280}$ das amostras no protocolo 1 se mostraram superiores às obtidas pelo protocolo 2, sendo que 85,7% das amostras cujo DNA foi extraído de acordo com a metodologia do protocolo 1 apresentaram uma razão $A_{260/280}$ entre 1,7 e 2,0. Uma razão

inferior corresponde à possível presença de proteínas ou substâncias aromáticas que podem inibir a PCR. Em contraste, uma razão maior indica frequentemente presença de RNA que interfere na qualidade do DNA¹⁴⁻¹⁵. A utilização de proteinase K e RNase A por meio do protocolo 1

pode indicar a alta qualidade do DNA extraído comparado com o protocolo 2, cujo processo não descreve a utilização de tais enzimas para a eliminação de proteínas e RNA. No entanto, é observado que em ambos os protocolos o nível de processamento interfere tanto na qualidade como na quantidade de material genético obtido.

Tendo em vista os diferentes níveis de processamento das amostras empregadas verificou-se que, quanto mais elevado o processamento dos gêneros alimentícios, menor a concentração e pureza do DNA extraído, comprovando que o grau de processamento dos alimentos pode influenciar negativamente na qualidade e quantidade de DNA isolado¹⁶⁻¹⁷.

PCR qualitativa

A reação de PCR foi conduzida a partir das amostras que apresentaram maior rendimento e pureza. Desta forma, somente as amostras cujo DNA foi extraído seguindo o protocolo 1 foram empregadas para análise de detecção do material transgênico dos produtos derivados de milho.

Para a detecção de resíduos de transgênicos, os dois pares de *primers* Cry1a e MaiY foram utilizados na PCR qualitativa. O *primer* ZEO foi empregado como controlo constitutivo para confirmar a procedência das amostras derivadas de milho e avaliar possíveis resultados falsos-negativos.

O fragmento de DNA amplificado do gene constitutivo delta zeína foi obtido em todas as 14 amostras analisadas, comprovando a procedência das amostras para posterior análise com os demais *primers*.

A eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR mostra um fragmento de 277pb (*cf.* Figura 1A), que corresponde ao gene delta zeína presente no milho (*Zea mays*). Nenhum fragmento foi observado no controlo negativo (DNA de soja) e no branco (reação de PCR sem DNA template), confirmando que não houve contaminação da reação e do processo de extração do DNA, respetivamente.

Os *primers* Cry1a e MaiY empregados para a detecção dos eventos transgênicos Bt11 e TC1507 amplificaram na maioria das amostras avaliadas no presente estudo. Dentre as amostras empregadas neste estudo 64,28% foram positivas para a detecção do gene Cry1a (*cf.* Figura 2B) e 92,85% para o gene Cry1F (*cf.* Figura 2C). Logo, das 14 amostras analisadas, 9 apresentavam o evento transgênico para o milho Bt11 e 13 amostras o evento TC1507.

Observa-se que nenhum produto da PCR foi verificado no controlo negativo (amostra C-), uma vez que se tratava de uma amostra de milho 0% transgênica. O fragmento observado nas amostras analisadas apresentou-se no controlo positivo (amostra C+) com 1% de milho OGM, o que confirma a detecção dos eventos transgênicos.

Os resultados obtidos demonstram que em um mesmo produto pode haver a presença de mais de um tipo de evento transgênico, já que entre as 14 amostras avaliadas oito apresentaram-se positivas para a detecção de ambos os eventos (Bt 11 e TC1507).

As amostras mistura de bolo sabor artificial de fubá, amido de milho, farinha de milho e milho em grão (amos-

tras 5, 7, 8, 11 e 14, respetivamente – *cf.* Figura 2B) foram negativas para a amplificação do *primer* Cry1a. Porém, a amostra mistura de bolo sabor artificial de milho (amostra 3 – *cf.* Figura 2C) foi negativa para a amplificação do *primer* MAIY.

Resume-se que em 57% das amostras houve amplificação para ambos os *primers* (MAIY e Cry1a) comprovando a origem transgênica da matéria prima utilizada para a produção de tais ingredientes alimentares. Segundo um estudo publicado em 2011⁸, o número de produtos transgênicos tende a crescer nos próximos anos diante dos avanços biotecnológicos. Assim, a detecção de OGM torna-se extremamente necessária não só apenas para detetar os eventos transgênicos já disponíveis para o consumo, mas principalmente para investigação daqueles que não foram autorizados para o mercado consumidor, sendo neste caso necessário e de fundamental importância a investigação dos eventos OGM baseada na investigação das regiões reguladoras utilizadas para a construção da maioria dos OGM como, por exemplo, o promotor CaMV25S e o terminador NOS, permitindo detetar alimentos OGMs desconhecidos e não autorizados no mercado.

Apesar de a técnica de PCR empregada não permitir uma análise direta da quantidade de material geneticamente modificado presente nos produtos alimentícios estudados, ela permite detetar quais eventos estão sendo empregados nos diferentes produtos consumidos no mercado brasileiro e confirmar, em conjunto com análises quantitativas, a possibilidade da existência de produtos sendo comercializados com percentagem superior a 1% de milho OGM¹⁸. Conforme apresentado, há produtos com mais de um tipo de evento transgênico, o que pode sugerir uma presença superior a 1% de OGM, sendo obrigatória a rotulagem para estes produtos, como requer a legislação, uma vez que em nenhum dos gêneros alimentícios estudados foi verificada informações quanto à presença de milho transgênico.

Outro estudo referente à detecção de OGM¹² demonstrou que, dentre 14 amostras avaliadas quanto à transgenia, nove mostraram-se positivas para eventos de milho MON810 e 3 para o milho Bt11. Também em um estudo mais amplo entre 2000 a 2005¹⁹ se detetou em 100 produtos contendo milho, totalizando de 4% a 6% de produtos transgênicos que continham mais do que 1% de milho geneticamente modificado e não apresentava a rotulagem estabelecida pela legislação.

Estes resultados ressaltam a importância dos estudos de detecção e identificação de OGM presentes nos ingredientes consumidos, uma vez que o milho é caracterizado pelas diversas formas de sua utilização na indústria alimentícia, tanto para o consumo humano como animal.

Conclusão

Apesar das limitações na metodologia de extração do material genético em produtos processados, foi possível obter, a partir de determinadas modificações, o protocolo

mais eficiente entre os dois comparados, sendo possível detectar entre as amostras analisadas aquelas em que havia a presença do milho Bt11 e TC1507.

Assim, em novas investigações é conveniente analisar um número maior de amostras alimentares derivadas de milho, bem como realizar a quantificação do material OGM presente, a fim de verificar o cumprimento da legislação imposta para a comercialização dos alimentos transgênicos.

Referências bibliográficas

1. Cardarelli P, Branquinho MR, Ferreira RT, Cruz FP, Gemal AL. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. *Food Control*. 2005;16(10):859-66.
2. Dinon AZ, Arisi AC. Screening maize food products sold in Brazil from 2005 to 2007 for the presence of cryIA(b) gene and P35S promoter. *Int J Biosafety Biosecur*. 2010;1(1).
3. Brasil. Ministério da Justiça. Portaria nº 2658, de 22 de dezembro de 2003. Regulamenta o emprego do símbolo no rotulo dos produtos transgênicos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. 2003 Dez 26.
4. Ferrari CS, Valente LL, Brod FC, Tagliari C, Sant'Anna ES, Arisi AC. Evaluation of polymerase chain reaction and DNA isolation protocols for detection of genetically modified soybean. *Int J Food Sci Technol*. 2007;42(10):1249-55.
5. Barros NE, Oliveira EM, Marin VA. Aplicabilidade da metodologia de reação de cadeia polimerase em tempo real, na determinação de organismos geneticamente modificados em alimentos [Applicability of the real-time polymerase chain reaction based-methods in quantification of genetically modified organisms in foods]. *Rev Nutr*. 2008;21(1):85-92. Portuguese
6. Faustino R, Sousa A, Loureiro M, Mendes L, Brito M. Detecção e quantificação de soja geneticamente modificada em gêneros alimentícios, comercializados em Portugal, para consumo humano [Detection and quantification of genetically modified soy in foodstuffs, commercialized in Portugal, for human consumption]. *Saúde & Tecnologia*. 2009;3(3):19-21. Portuguese
7. Jouanin L, Bonadé-Bottino M, Girard C, Morrot G, Giband M. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci*. 1998;131(1):1-11.
8. Mota AA. Transgenia no Brasil: eventos autorizados e cultivares registrados [Monograph]. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2011. Portuguese
9. Ferreira ME, Grattapaglia D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN; 1996.
10. Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, Pauwels J, Anklam E. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *J AOAC Int*. 1999;82(4):923-8.
11. Gürakan GC, Aydin G, Yilmaz R. Qualitative detection of maize (Bt11) in food and feed sold commercially in Turkey by PCR based methods. *Ind J Biotechnol*. 2011;10:143-6.
12. Mazzara M, Foti N, Price S, Paoletti C, Van den Eede G. Event-specific method for the quantitation of maize line TC1507 using real-time PCR. Brussels: European Commission; 2005.
13. Cobiaishi DM. Avaliação da metodologia de detecção e quantificação por PCR em tempo real de organismos geneticamente modificados em alimentos: aspectos de produção, processamento e amostragem [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2012. Portuguese
14. Costa TE. Detecção de transgênicos em alimentos utilizando a técnica multiplex-PCR [Dissertation]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2008. Portuguese
15. Teare JM, Islam R, Flanagan R, Gallagher S, Davies MG, Grabau C. Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant. *Biotechniques*. 1997;22(6):1170-4.
16. Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pinjnenburg H, Van den Eege G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur Food Res Technol*. 2002;214(1):3-26.
17. Ahmed FE. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol*. 2002;20(5):215-23.
18. Branquinho MR. Estudo da quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos pela técnica da reação em cadeia pela polimerase em tempo real: desenvolvimento de método evento específico [Dissertation]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2010. Portuguese
19. Greiner R, Konietzny U. Presence of genetically modified maize and soy in food products sold commercially in Brazil from 2000 to 2005. *Food Control*. 2008;19(5):499-505.

Artigo recebido em 06.06.2013 e aprovado em 09.05.2014