

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

Andréia Zilio Dinon

**DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES E SONDAS PARA
DETECÇÃO DE *cry1A.105* E *cry2Ab2* E APLICAÇÃO DE PCR E
PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE OGM EM
ALIMENTOS**

Florianópolis
2011

Andréia Zilio Dinon

**DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES E SONDAS PARA
DETECÇÃO DE *cry1A.105* E *cry2Ab2* E APLICAÇÃO DE PCR E
PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE OGM EM
ALIMENTOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Ciência dos Alimentos.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina
Maisonave Arisi.

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

Dinon, Andréia Zilio

Desenvolvimento de iniciadores e sondas para detecção de *cryIA.105* e *cry2Ab2* e aplicação de PCR e PCR em tempo real para detecção de OGM em alimentos [tese] / Andréia Zilio Dinon ; orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi. - Florianópolis, SC, 2011. 96 p.: il., grafs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Tecnologia de alimentos. 2. Ciência dos alimentos.
3. OGM. 4. DNA. 5. PCR. 6. PCR em tempo real. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À Jeová Deus, pela força ativa da vida.

Aos meus queridos pais Nilva e Heitor e ao meu irmão Fabrício, pela compreensão, carinho, sábios conselhos e incentivo em todos os momentos.

À professora Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela orientação e apoio.

À todos os co-autores desta tese, pela valiosa parceria e auxílio na realização deste trabalho.

A todos os professores, colegas de laboratório e novos amigos, pelos conhecimentos compartilhados e agradável companheirismo.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela realização deste curso.

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

Ao projeto de cooperação internacional CAPES/Wageningen n. 005/09, ao Instituto de Segurança Alimentar RIKILT e a Universidade de Wageningen, Holanda, que possibilitaram o intercâmbio para o desenvolvimento de parte dessa tese.

À CAPES, ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo financiamento deste trabalho.

A maior recompensa para o trabalho do homem
não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.
John Ruskin

DINON, A.Z. Desenvolvimento de iniciadores e sondas para detecção de *cryIA.105* e *cry2Ab2* e aplicação de PCR e PCR em tempo real para detecção de OGM em alimentos. 2011. 129 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR quantitativa em tempo real são usadas para detecção e quantificação de ingredientes geneticamente modificados (GM) em alimentos. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver iniciadores e sondas para detecção dos elementos *cryIA.105* e *cry2Ab2* presentes no evento de milho GM MON89034; aplicar técnicas de PCR e PCR em tempo real para avaliar alimentos disponíveis no mercado brasileiro quanto à presença de material GM; e analisar os resultados segundo as exigências de legislação e rotulagem para esses produtos. Diferentes alimentos derivados de milho e soja foram analisados quanto à presença dos eventos de milho GM Bt11 e Bt176 e do evento de soja GM Roundup Ready (RR). No primeiro estudo, a presença dos eventos de milho GM Bt11 e Bt176 foi avaliada em 81 produtos derivados de milho (farinha de milho, fubá, biju e polenta) comercializados no Brasil. Foi observada a ausência dos eventos Bt11 e Bt176 em todas as amostras analisadas. No segundo estudo, PCR e PCR em tempo real foram aplicadas a fim de detectar e quantificar o evento de soja RR em produtos à base de soja e em derivados de carne. No total de 59 amostras analisadas, seis foram positivas para presença do evento de soja RR e apenas uma amostra apresentou soja RR acima do limite para rotulagem. No terceiro estudo, iniciadores e sondas foram desenvolvidos e avaliados em termos de especificidade, eficiência e limite de detecção para identificação específica dos elementos *cryIA.105* e *cry2Ab2* presentes no evento de milho GM MON89034. Os resultados mostraram alta especificidade e eficiência para detecção de *cryIA.105* e *cry2Ab2* sendo o limite de detecção entre 0,05 e 0,01 ng de DNA por PCR para ambos os ensaios. Este trabalho permitiu confirmar a importância e a aplicabilidade da PCR e da PCR em tempo real para detecção e quantificação de eventos e elementos GM em alimentos.

Palavras-chave: análise de alimentos, OGM, DNA, milho, soja, carne, PCR, PCR em tempo real.

DINON, A.Z. Development of primers and probes for *cryIA.105* and *cry2Ab2* detection and application of PCR and real time PCR for detection of GMO in foods. 2011. 129 p. Thesis (Ph.D. in Food Science), Program of Post Graduation in Food Science, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

Polymerase Chain Reaction (PCR) and quantitative real time PCR have been used to detect and to quantify genetically modified (GM) ingredients in foods. The aims of this work were: to develop primers and probes for detection of the *cryIA.105* and *cry2Ab2* elements present in GM maize event MON89034; to apply PCR and real time PCR to evaluate the presence of GM material in foods available at Brazilian market; and to analyze the results according to law and label requirements for these products. Different types of foods derived from maize and soy were analyzed for the presence of GM maize events Bt11 and Bt176 and GM soybean event Roundup Ready (RR). On the first study, the presence of GM maize events Bt11 and Bt176 was evaluated in 81 products derived from maize (maize flour, corn meal, maize flour flakes and polenta) commercialized in Brazil. It was observed the absence of GM maize Bt11 and Bt176 in all samples analyzed. On the second study, PCR and real time PCR were applied to detect and to quantify RR soybean event present in soy and meat derived products. A total of 59 samples were analyzed, six of them were positive to the presence of RR soybean event and only one sample showed RR soybean above the limit to be labeled. On the third study, primers and probes were developed and evaluated in terms of specificity, efficiency and limit of detection for specific detection of *cryIA.105* and *cry2Ab2* elements present in GM maize event MON89034. The results showed high specificity and efficiency to detect *cryIA.105* and *cry2Ab2* with a detection limit between 0.05 and 0.01 ng of DNA per PCR for both assays. This work allowed confirming the importance and the applicability of PCR and real time PCR to detect and to quantify GM events and elements in foods.

Key-words: food analysis, GMO, DNA, maize, soy, meat, PCR, real time PCR.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1 Diagrama esquemático de construções gênicas presentes nos eventos de milho GM.33
- Figura 1.2 Representação da construção gênica presente no evento de soja GM Roundup Ready® (RR). 34
- Figura 1.3 Representação esquemática de alvos para detecção de elementos e eventos geneticamente modificados por meio da PCR.36
- Figura 1.4 Representação das etapas da PCR para amplificação de DNA.....37
- Figura 1.5 *Nested* PCR com os iniciadores mg1/mg2 e mg3/mg4 para amplificação do DNA recombinante presente no evento de milho MON810. 39
- Figura 1.6 Representação da PCR em tempo real com sondas Taqman.41
- Figura 1.7 Gráfico de amplificação por PCR em tempo real.43
- Figura 1.8 Princípio da análise de multidetecção.....46

Capítulo 2

- Figura 2.1 PCR para detecção do milho Bt11 com os iniciadores IVS2/PATB..... 62
- Figura 2.2 Sensibilidade da *nested* PCR para detecção do milho Bt176 usando quantidade constante de DNA geneticamente modificado (GM) em amostras não GM (1:10, v/v) 63

Capítulo 3

Figura 3.1 Curva de calibração ΔC_t do P35S versus o logaritmo do Material de Referência Certificado contendo 1, 5, 10, 20 e 50 g.kg⁻¹ de soja Roundup Ready™ usando *TaqMan GMO 35S Soy Detection Kit* (Applied Biosystems, CA, EUA) e 50 ng de DNA/reacção..... 75

Capítulo 4

Figure 4.1 Amplification plots and linear regression of 8th PCR run for GM maize MON89034. a cry1A.105 detection. b cry2Ab2 detection. 102

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1	Eventos de soja e milho geneticamente modificados aprovados para produção e comercialização no Brasil	28
------------	--	----

Capítulo 2

Tabela 2.1	Iniciadores usados para detecção qualitativa do milho convencional e dos eventos de milho GM Bt176 e Bt11.	59
------------	---	----

Capítulo 3

Tabela 3.1	Detecção de soja Roundup Ready™ (RR) por <i>nested</i> PCR em amostras brasileiras de produtos cárneos e derivados de soja.....	74
------------	---	----

Tabela 3.2	Conteúdo de OGM para amostras brasileiras de produtos cárneos e derivados de soja estimada por PCR em tempo real usando TaqMan GMO 35S Soy Detection Kit.....	76
------------	---	----

Capítulo 4

Table 4.1	- Primers and probes for <i>cry</i> genes and <i>hmg</i> gene detection. F = forward primer, R = reverse primer, P = probe.	87
------------------	--	----

Table 4.2	- Comparison of primers and probe sequences with related <i>cry</i> sequences from <i>B. thuringiensis</i> and GM events. Only nucleotides that differed from <i>cry1A.105</i> (A) or <i>cry2Ab2</i> (B) are indicated. Identity was calculated based only on the primers and probe sequences. F = forward primer, R = reverse primer, P = probe.....	91
------------------	---	----

Table 4.3	- List of Certified Reference Materials used to assess the specificity of the <i>cry1A.105</i> and <i>cry2Ab2</i> primers and the results obtained after duplicate testing.....	93
------------------	---	----

Table 4.4 - Limit of detection for *cryIA.105* and *cry2Ab2* in a total of 64 samples tested in 8 independent PCR runs for 2 different concentrations (0.05 and 0.01 ng DNA/PCR)..... 95

Table 4.5 - Parameters of PCR standard curve for *cryIA.105* and *cry2Ab2* detection based on 9 PCR runs with samples tested in duplicate for 150, 30, 6, 1.20, 0.60, 0.25 and 0.05 ng DNA per PCR reaction..... 97

LISTA DE ABREVIATURAS

AGBIOS	<i>Agriculture and Biotechnology Strategies Inc.</i>
Bt	<i>Bacillus thuringensis</i>
CaMV 35S	<i>Promoter 35S from Cauliflower Mosaic Virus</i>
CNBS	Conselho Nacional de Biossegurança
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CRM	<i>Certified Reference Material</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i> , limite de detecção
CTAB	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>
CTNBIO	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ENGL	Rede de Laboratórios Europeus de Análise de OGM
EURL	Laboratórios de Referência da União Européia
GM	Geneticamente Modificado
GMO	<i>Genetically Modified Organism</i>
IRMM	<i>Institute of Reference Materials and Measurements</i>
LOD	Limite de detecção
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
P35S	promotor 35S
RIKILT	Instituto de Segurança Alimentar da Holanda
RR	<i>Roundup Ready</i> ®
PCR tempo real	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TNOS	elemento terminador derivado do gene <i>nopalina sintase</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
CAPÍTULO 1	25
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
1.1 Variedades Geneticamente Modificadas	27
1.1.1 Milho GM	30
1.1.2 Soja GM	34
1.2 Legislação brasileira e internacional	34
1.3 Métodos de análise de OGM.....	35
1.4 Amplificação por PCR	37
1.4.1 <i>Nested</i> PCR	38
1.4.2 PCR multiplex	39
1.4.3 PCR em Tempo Real.....	39
1.5 Quantificação relativa de OGM por PCR em tempo real.....	43
1.6 Métodos de multidetecção de OGMs	45
1.7 Desafios e perspectivas na análise de alimentos GM.....	47
OBJETIVOS	51
CAPÍTULO 2.....	53
2. Monitoramento do milho geneticamente modificado Bt11 e Bt176 em alimentos comercializados no Brasil de 2005 a 2007	55
2.1 Introdução	56
2.2 Material e métodos	57
2.2.1 Amostras	57
2.2.2 Extração de DNA	57
2.2.3 Condições da PCR.....	58
2.2.4 Eletroforese em gel de agarose.....	60
2.3 Resultados e Discussão	60
2.4 Conclusão.....	65
CAPÍTULO 3.....	67
3. Monitoramento de organismos geneticamente modificados em derivados cárneos e produtos à base de soja comercializados no Brasil de 2007 a 2008	69
3.1 Introdução	71
3.2 Material e Métodos.....	72
3.2.1 Amostras e material de referência.....	72
3.2.2 Isolamento do DNA	72

3.2.3 Condições da PCR qualitativa.....	72
3.2.4 Condições da PCR Quantitativa.....	73
3.3 Resultados e Discussão	73
3.4 Conclusão.....	77
CAPÍTULO 4.....	79
4.1 Introduction.....	82
4.2 Materials and Methods.....	85
4.2.1 Sample material and DNA isolation	85
4.2.2 Primer design	86
4.2.3 Real-time PCR	88
4.3 Results.....	89
4.3.1 DNA quality.....	89
4.3.2 Primer and probe design	89
4.3.3 Specificity	92
4.3.4 Limit of detection.....	94
4.3.5 Efficiency.....	96
4.4 Discussion.....	99
4.4.1 Primer design and analysis of specificity.....	99
4.4.2 Limit of detection.....	100
4.4.3 Efficiency and quantitative response	101
4.5 Conclusions.....	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
REFERÊNCIAS.....	106
APÊNDICE.....	127

INTRODUÇÃO

A área global de cultivo de plantas geneticamente modificadas (GM) superou 100 milhões de hectares em 2010. Os principais produtores de lavouras GM no mundo são: EUA (66,8 milhões de hectares), Brasil (25,4), Argentina (22,9), Índia (9,4), Canadá (8,8), China (3,5), Paraguai (2,6), Paquistão (2,4), África do Sul (2,2) e Uruguai (1,1 milhões de hectares). A soja GM é a planta mais cultivada (73,3 milhões de hectares) seguida pelo milho GM (46,8 milhões de hectares) e canola GM (7,0 milhões de hectares) correspondendo, respectivamente, a 50%, 31% e 5% da área global destinada ao cultivo GM (JAMES, 2010). No Brasil, o cultivo e a liberação comercial de variedades GM depende da aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e do Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS). As variedades de alimentos GMs aprovadas para comércio e plantio no Brasil incluem 15 eventos de milho GM e 5 eventos de soja GM com tolerância a herbicidas e/ou resistência a insetos da ordem Lepidóptera (MAPA, 2011). A maioria dessas plantas GM já é comercializada em outros países da América do Sul, inclusive na Argentina, Colômbia e Uruguai.

Em 2003, o governo brasileiro aprovou o decreto N° 4680 que determina que todos os alimentos para o consumo humano que apresentem quantidade igual ou superior a 1%, ou seja, maior ou igual a 10 g.kg^{-1} de organismos geneticamente modificados (OGM) devem apresentar esta informação no rótulo (BRASIL, 2003). Este regulamento foi publicado antes da liberação comercial do milho GM no Brasil. Consequentemente, para o cumprimento da legislação brasileira, é necessário monitorar a presença de produtos derivados de variedades GMs aprovadas e não aprovadas disponíveis no mercado.

Na União Européia um total de 36 eventos de plantas GM foi aprovado até março de 2011, incluindo 22 diferentes eventos de milho, 6 de algodão, 3 de canola, 3 de soja, 1 de batata e 1 de beterraba (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Laboratórios de Referência da União Européia (EURL) possuem métodos oficiais para detecção e quantificação evento-específico de todos os OGMs que estão autorizados bem como métodos evento-específico ou construção-específico para detecção de um grande número de OGMs que ainda não foram autorizados para o comércio na União Européia.

Embora não existam dados oficiais, conforme relatório anual publicado por James (2010), os principais produtores de variedades GM na União Européia incluem Espanha, República Tcheca, Romênia,

Portugal, Alemanha, Polónia e Eslováquia. O milho Bt MON810 é a única variedade GM cultivada em alguns países europeus (<http://www.gmo-compass.org/eng/home/>). OGMs e alimentos derivados de OGMs presentes no mercado europeu precisam cumprir requerimentos de rotulagem e rastreabilidade. A rotulagem é obrigatória para todos os produtos que apresentem material GM acima de 0,9% (EUROPEAN COMMISSION, 2003).

Uma discussão importante que está diretamente relacionada à introdução de variedades de grãos GM no mercado mundial é a rastreabilidade, incluindo aspectos de detecção, identificação, quantificação e administração da cadeia produtiva. Rastreabilidade refere-se à habilidade de detectar OGMs e produtos derivados de OGMs em todas as fases da cadeia produtiva até sua chegada ao mercado (EUROPEAN COMMISSION, 2004a). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método analítico mais utilizado na detecção de OGM devido à sua alta sensibilidade e especificidade na amplificação do DNA (ANKLAM et al., 2002; ELENIS et al., 2008; MICHELINI et al., 2008). OGMs são detectados em matrizes alimentares simples e complexas pela aplicação de métodos qualitativos e quantitativos de PCR. A fim de alcançar este objetivo é necessário o desenvolvimento e o aprimoramento de métodos analíticos para detecção e quantificação de OGMs (MARMIROLI et al., 2008). Atualmente, a PCR quantitativa em tempo real é usada para detecção e quantificação de ingredientes GM em alimentos humanos e produtos de ração animal (TERRY; HARRIS, 2002; TAVERNIERS et al., 2004; HUANG; PAN, 2005).

Na Holanda, o RIKILT – Instituto de Segurança Alimentar - é membro da Rede de Laboratórios Europeus de Análise de OGM (<http://engl.jrc.ec.europa.eu/>) e está envolvido no desenvolvimento, avaliação, validação e acreditação de métodos para análises qualitativas e quantitativas, conforme padrões europeus e internacionais. O RIKILT recentemente desenvolveu diferentes métodos para detecção de OGM (SZEMES et al., 2005; PRINS et al., 2008; PRINS, et al. 2010). Entretanto, a validação e a acreditação de novos métodos de análise são necessários para cada nova variedade GM que entra no mercado mundial. Também existe uma necessidade urgente para o desenvolvimento de métodos de multidetecção de OGMs.

O projeto de cooperação internacional (CAPES/Wageningen projeto n. 005/09), aprovado pela CAPES em maio de 2009 envolve a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e o RIKILT, Universidade de Wageningen, Holanda, e possibilitou o intercâmbio de

estudantes por meio da concessão de bolsa de doutorado sanduíche. No RIKILT, o projeto é coordenado pela Dra. Esther J. Kok.

Sendo assim, o presente projeto de tese de doutorado envolveu o uso de técnicas de PCR e PCR em tempo real para a análise de variedades GMs em alimentos comercializados no Brasil pelas atividades realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina e o desenvolvimento de iniciadores e sondas para detecção de *cryIA.105* e *cry2Ab2* por PCR em tempo real em atividades realizadas no RIKILT, Universidade de Wageningen, Holanda.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Variedades Geneticamente Modificadas

A produção de variedades geneticamente modificadas (GMs) utiliza a tecnologia do DNA recombinante e baseia-se na transformação genética pela inserção no genoma da planta de uma ou mais sequências, geralmente isoladas de espécies diferentes, de forma a garantir a expressão do(s) gene(s) de interesse. As características genéticas modificadas em plantas e microrganismos fornecem a eles novas propriedades, como a resistência de plantas a doenças e insetos, aumento da qualidade e do valor nutricional de alimentos, tolerância a herbicidas, entre outros (ANKLAM et al., 2002).

A construção de OGMs para expressar determinado gene normalmente utiliza três elementos básicos no cassete de expressão: o promotor, que controla a transcrição do gene no organismo; a região codificadora, que codifica a proteína recombinante de interesse; e a região terminadora, que determina o final do processo de transcrição do gene. Além disto, pode ser adicionado um gene marcador que confere resistência a antibióticos, por exemplo, o gene que codifica a enzima β -lactamase que confere resistência ao antibiótico penicilina e serve para selecionar as células que, de fato, foram transformadas. O elemento promotor mais utilizado é o P35S, promotor derivado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), e o elemento terminador mais utilizado é o TNOS, derivado do gene da nopalina sintase do plasmídeo Ti da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Estes dois elementos estão presentes em muitas plantas GM (WOLF et al., 2000).

No Brasil, as variedades GMs são avaliadas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e pelo Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) a fim de obter liberação para o plantio e para o comércio. Os 20 alimentos GM aprovados para cultivo e comércio no Brasil incluem 5 eventos de soja e 15 de milho conforme dados oficiais da CTNBio (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Eventos de soja e milho geneticamente modificados aprovados para produção e comercialização no Brasil.

Soja GM	Evento aprovado	Característica de interesse	Principais elementos inseridos
1998	soja RR® ou GTS 40-3-2	Tolerante a herbicida	<i>cp4epsps</i>
2009	evento BPS-CV127-9	Tolerante a herbicida	<i>csr 1-2</i>
2010	MON87701xMON89788 evento A2704-12 evento A5547-127	Tolerante a herbicida e resistente a inseto Tolerante a herbicida Tolerante a herbicida	<i>cp4epsps e cry1Ac</i> <i>pat</i> <i>pat</i>
Milho GM			
2007	T25 MON810	Tolerante a herbicida Resistente a inseto	<i>pat</i> <i>cry1Ab</i>
2008	TC1507 GA21 Bt11 NK603	Resistente a inseto Tolerante a herbicida Resistente a inseto e tolerante a herbicida Tolerante a herbicida	<i>cry1F</i> <i>mepsps</i> <i>cry1Ab e pat</i> <i>cp4epsps</i>

2009	<p>TC1507xNK603</p> <p>MON89034</p> <p>MIR162</p> <p>MON810xNK603</p> <p>Bt11xGA21</p>	<p>Resistente a inseto e tolerante a herbicida</p> <p>Resistente a inseto</p> <p>Resistente a inseto</p> <p>Resistente a inseto e tolerante a herbicida</p> <p>Tolerante a herbicida e resistente a inseto</p>	<p><i>cry1F e cp4epsps</i></p> <p><i>cry1A.105 e cry2Ab2</i></p> <p><i>vip3Aa20</i></p> <p><i>cp4epsps e cry1Ab</i></p> <p><i>cry1Ab e mepsps</i></p>
2010	<p>MON89034xTC1507xNK603</p> <p>MON88017</p> <p>MON89034xNK603</p> <p>Bt11xMIR162xGA21</p>	<p>Resistente a inseto e tolerante a herbicida</p>	<p><i>cry1A.105, cry2Ab2, cry1F, cp4epsps</i></p> <p><i>cp4epsps</i></p> <p><i>cry3Bb1</i></p> <p><i>cry1A.105</i></p> <p><i>cry2Ab2</i></p> <p><i>cp4epsps</i></p> <p><i>cry1Ab</i></p> <p><i>vip3Aa20</i></p> <p><i>mepsps</i></p>

Fonte: CTNBio, 2011; ISAA, 2011; MAPA, 2011.

1.1.1 Milho GM

Existem diversos eventos de milho GM que apresentam diferentes cassetes de expressão (LIPP et al., 1999; CHIUEH et al., 2001; MATSUOKA et al., 2002; YAMAGUCHI et al., 2003; YU et al., 2004). A modificação genética do milho que confere resistência a insetos da ordem dos Lepidópteros ou tolerância ao herbicida é a mais comum e esses tipos de modificações geralmente resultam na expressão de dois transgenes: *cry1A(b)* e *bar/pat*, respectivamente (MATSUOKA et al., 2002; YAMAGUCHI et al., 2003; JAMES, 2009).

O gene *cry1A(b)* (clonado da bactéria do solo *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki* cepa HD-1, conhecido por Bt), promove resistência a insetos parasitas do milho, como a broca (*Ostrinia nubilalis*), principal parasita do milho responsável pela perda de 5-10% da produtividade das áreas cultivadas (BATS, 2003; QUERCI; MAZZARA, 2004).

O efeito inseticida ocorre provavelmente pela ligação específica das proteínas Cry sobre receptores intestinais do inseto o que causa danos a membrana celular e morte do inseto (BARBETA et al., 2008). Este efeito tóxico seletivo não se estende aos outros organismos que não tenham tais receptores compatíveis, tornando a toxina Bt inerte a seres humanos, outros animais e insetos (RANJEKAR et al., 2003; QUERCI; MAZZARA, 2004). Várias subespécies de Bt são conhecidas e efetivas contra diferentes tipos de insetos porque possuem diferentes genes *cry* e produzem toxinas específicas. As principais versões deste gene utilizadas em milho são os genes *cry1A(b)* e *cry1A(c)* que codificam toxinas efetivas aos insetos da ordem Lepidoptera (CRICKMORE et al., 1998; BATS, 2003).

Os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* do *B. thuringiensis* estão presentes no milho GM MON89034 e conferem resistência a insetos da ordem Lepidoptera, especialmente insetos das espécies *Ostrinia* e *Diatrea* (ANDERSON et al., 2008). O gene *cry1A.105* codifica uma proteína que apresenta 93 a 76% de homologia com as proteínas Cry1Ac, Cry1Ab e Cry1F do *B. thuringiensis* (CANADIAN FOOD AUTHORITY, 2009). A proteína Cry2Ab presente no milho GM MON89034 também está presente no algodão GM MON15985 (CORBISIER et al., 2010).

O gene *bar*, derivado de *Streptomyces higroscopicus*, e o gene *pat*, derivado de *Streptomyces viridochromogenes*, codificam a enzima fosfotricina acetiltransferase que promove tolerância ao herbicida glufosinato de amônio pela inativação da L-fosfotricina, componente

ativo do herbicida (QUERCI; MAZZARA, 2004). Os eventos de milho GM T25 e Bt11 apresentam o gene *pat* (MATSUOKA et al., 2002).

O promotor P35S derivado do vírus do mosaico da couve-flor é uma sequência amplamente utilizada em muitas sementes GM para obter uma alta expressão constitutiva do gene inserido na planta modificada. Está presente nos eventos GM do milho Event 176, Bt11, T25 e MON810 (MATSUOKA et al., 2002).

Mais de 21 diferentes eventos de milho GM são cultivados e comercializados como alimento humano e/ou animal (AGBIOS, 2011). Os eventos tolerantes a insetos e resistentes a herbicidas mais cultivados são: Bt11, Bt176, MON810 e LIBERTY (YAMAGUCHI et al., 2003; GREINER; KONIETZNY; VILLAVICENCIO, 2005).

O evento de milho Bt11, desenvolvido pela Novartis (*Syngenta Seeds Mycogen Corporation*), expressa os dois genes *cry1A(b)* e *bar* (Figura 1.1-A), localizado em diferentes construções, que estão sob o controle do promotor P35S e do terminador TNOS (MATSUOKA et al., 2002).

O milho Bt176 (Novartis, *Syngenta Seeds Mycogen Corporation*) expressa os genes *cry1A(b)* e *bar* (Figura 1.1-B). O gene *cry1A(b)* é expresso no milho, sob o controle do promotor do gene codificador da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (P-PEPC) e no pólen, sob o controle do promotor do gene codificador da proteína quinase cálcio-dependente (P-CDPK). O terminador utilizado é o T35S derivado do vírus do mosaico da couve-flor e inclui a sequência de intron 9 do gene codificador da enzima fosfoenolpiruvato-carboxilase do milho (PEPC Intr.#9). A expressão do gene *bar* está sob o controle do P35S e do T35S do vírus do mosaico da couve flor. A comercialização do milho Bt176 foi aprovada nos EUA em 1995 e na Europa em 1997 tanto para ração animal como para processamento industrial (QUERCI; MAZZARA, 2004).

O evento de milho MON810 (Figura 1.1-C), desenvolvido pela Monsanto, expressa o gene *cry1A(b)* sob o controle do P35S (YAMAGUCHI et al., 2003), resultando na expressão deste gene em todos os tecidos do milho (MATSUOKA et al., 2002; MARGARIT et al., 2006). O gene *cry1A(b)* está truncado, ou seja, a inserção ocorreu de forma incompleta no milho MON810 devido a perda da região 3' da construção original (HERNANDEZ et al., 2004). O plantio do milho MON810 foi aprovado nos EUA em 1996 e a comercialização em 1998, como alimento e ração animal. O seu plantio e comercialização também foram aprovados na Argentina, Austrália, Japão, África do Sul e Suíça (QUERCI; MAZZARA, 2004).

Os eventos de milho T14 e T25 (Figura 1.1-E, F), que correspondem a modificações genéticas do milho LIBERTY-Link, foram desenvolvidas pela *Bayer/Aventis CropScience* (AgrEvo). Ambos expressam os genes *bar* e *pat* sob o controle do promotor 35S e dos terminadores TNOS e T35S, respectivamente (MATSUOKA et al., 2002; YAMAGUCHI et al., 2003).

O milho NK603 (Figura 1.1-G) desenvolvido pela Monsanto apresenta tolerância ao herbicida glifosato pela presença de dois cassetes de expressão do gene codificador da enzima EPSPS (3-enolpiruvilchiquimato-5-fosfato sintase). Cada cassete contém uma cópia simples do gene *cp4 epsps* e das respectivas sequências regulatórias. No primeiro cassete, a expressão do gene *cp4 epsps* é regulada pelo promotor da actina do arroz associado a um íntron e o TNOS. No segundo cassete, a expressão do gene *cp4 epsps* é controlada pelo P35S, íntron hsp70 do milho e TNOS. O plantio e a comercialização do milho NK603 foram aprovados no Brasil em 2008, tendo sido aprovado desde 2004 na União Européia como alimento e ração (AGBIOS, 2011).

O milho GA21 (Figura 1.1-H) foi desenvolvido pela Syngenta Seeds e apresenta tolerância ao herbicida glifosato. Possui o gene da enzima EPSPS modificado que é controlado pelo promotor da actina do arroz e pelo TNOS. Está aprovado para plantio e comércio no Brasil desde 2008 e na União Européia para o comércio como ração desde 2005 e como alimento desde 2006 (AGBIOS, 2011).

O milho TC1507 é produzido pela Pioneer e apresenta resistência à broca européia do milho e tolerância ao herbicida glifosinato de amônio. Possui dois cassetes de expressão. No primeiro cassete expressa o gene *pat*, o promotor e o terminador 35S. No segundo cassete expressa o gene *cryIF*, sob regulação do promotor do gene da ubiquitina do milho e o terminador ORF25 PolyA de *Agrobacterium tumefaciens*. Está aprovado para plantio e comércio no Brasil desde 2008 e na União Européia para o comércio como ração desde 2005 e como alimento desde 2006 (AGBIOS, 2011).

O milho MON89034 (Figura 1.1-I) é produzido pela Monsanto e possui os genes *cryIA.105* e *cry2Ab2* que conferem resistência a lepidópteros das espécies *Ostrinia* e *Diatraea* bem como favorecem o controle de larvas como *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* (ANDERSON et al., 2008). Estes mesmos genes estão presentes em combinações de eventos de milho GM que contêm o MON89034: MON89034 x MON88017, MON89034 x NK603 e MON89034 x TC1507 x MON88017 x DAS-59122-7 (TAYLOR et al., 2007). O

evento MON89034 foi aprovado para plantio e comercialização no Brasil e na União Européia desde 2009 (AGBIOS, 2011).

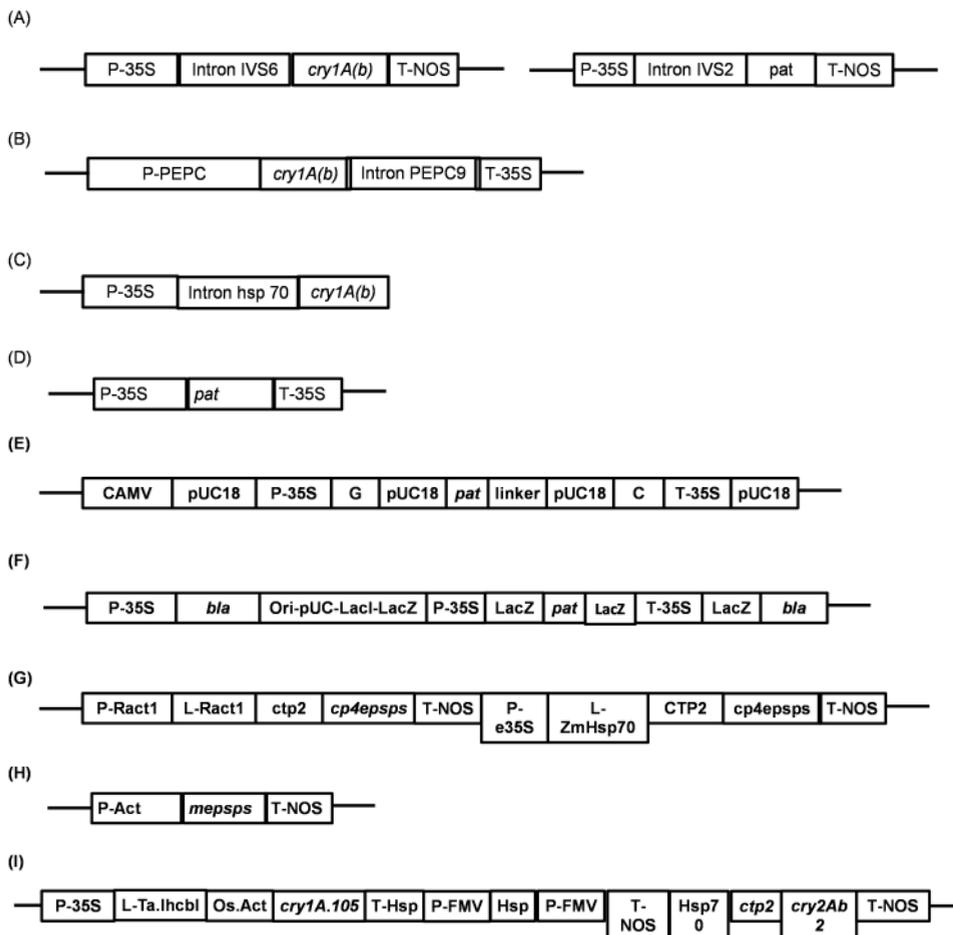


Figura 1.1 - Diagrama esquemático de construções gênicas presentes nos eventos de milho GM: (A) Bt11; (B) Bt176; (C) MON810; (D) LIBERTY; (E) T14; (F) T25; (G) NK603; (H) GA21; (I) MON89034 (adaptado de YAMAGUCHI et al., 2003; MATSUOKA et al., 2002).

1.1.2 Soja GM

A soja Roundup Ready (RR) GTS-40-3-2 foi desenvolvida pela Monsanto. Ela apresenta em seu genoma o gene CP4-EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens* que codifica a enzima EPSPS, responsável pela tolerância ao herbicida glifosato (PADGETTE et al., 1995).

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

A construção do DNA recombinante da soja RR contém o promotor P35S, o gene codificador do peptídeo de direcionamento ao cloroplasto da EPSPS de *Petúnia* (CTP), o gene codificador da EPSPS da *Agrobacterium* sp. linhagem CP4 e o terminador TNOS (Figura 1.2).



Figura 1. 2 – Representação da construção gênica presente no evento de soja GM Roundup Ready® (RR).

O evento de soja RR foi aprovado para cultivo nos EUA em 1994 e mundialmente ocupa uma área de produção de 73,3 milhões de hectares, que corresponde a 50% da área global destinada ao cultivo GM no mundo (JAMES, 2010). A produção e a comercialização de soja RR foram aprovadas no Brasil pelos artigos 35 e 36 da Lei n.11.105 (BRASIL, 2005).

1.2 Legislação brasileira e internacional

A comercialização de alimentos que apresentem material GM na sua composição está sujeita à rotulagem de acordo com regulamentos específicos de cada país. O cumprimento da legislação tem por finalidade garantir o direito de escolha do consumidor bem como controlar o comércio e a rastreabilidade da cadeia produtiva.

No Brasil, o Decreto Presidencial n. 4680 de 24 de abril de 2003, estabelece que alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal, que contenham ou sejam produzidos a

partir de OGMs, com presença acima do limite de 1% do produto devem obrigatoriamente apresentar essa informação no rótulo (BRASIL, 2003).

Na União Europeia, a legislação estabelece o limite de detecção de 0,9% para rotulagem de alimentos que contenham ou sejam produzidos com OGMs (EUROPEAN COMMISSION, 2003). Em diversos países, a rotulagem é obrigatória, mas os limites são variáveis: 3% na Coreia do Sul (KOREA, 2000), 5% no Japão e Taiwan (JAPAN, 2000), 1% na Austrália e na Nova Zelândia (STANDARD A18/2000). Nos EUA e no Canadá, a rotulagem é voluntária (CFS, 2006).

A fim de garantir o cumprimento da legislação vigente, é necessário utilizar e desenvolver sistemas apropriados de amostragem, materiais de referência confiáveis, bem como métodos analíticos que permitam a quantificação de OGMs (QUERCI et al., 2009).

1.3 Métodos de análise de OGM

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o sistema analítico mais usado na detecção de OGM devido à sua elevada sensibilidade e especificidade para amplificação do DNA (ANKLAM et al., 2002; HOLST-JENSEN et al., 2003; LIPP et al., 2005; ELENIS et al., 2008; MARMIROLI et al., 2008; MICHELINI et al., 2008). Conforme Holst-Jensen et al. (2003), a PCR qualitativa e/ou quantitativa está dividida em 4 níveis de especificidade:

- a) Métodos de triagem: pouco específicos, direcionados a detecção de elementos genéticos, como promotores e terminadores, comuns a vários eventos de transformação, como o P35S e o TNOS;
- b) Métodos gene-específicos: mais específicos, direcionados a detecção do gene responsável pela característica da planta, por exemplo, gene que codifica a proteína EPSPS em soja ou gene que codifica proteína Cry em milho. Apesar de mais específicos, esses métodos podem detectar genes utilizados em diferentes eventos GMs;
- c) Métodos construção-específicos: bem específicos, detectam sequências na junção entre dois elementos genéticos do transgene, por exemplo, o TNOS e o gene que codifica a proteína EPSPS da soja RR. Contudo, podem ocorrer resultados dúbios quando a mesma construção é usada em eventos de transformação diferentes;
- d) Métodos evento-específicos: alta especificidade; tem como alvo a junção entre o inserto de DNA e o genoma da planta.

São capazes de identificar e quantificar eventos específicos, porém, são incapazes de distinguir híbridos contendo dois ou mais eventos GMs (*stacked events*).

Os principais alvos para detecção por PCR estão representados na figura a seguir (Figura 1.3).

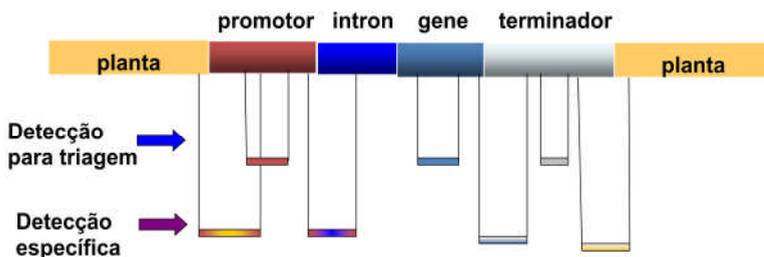


Figura 1.3 – Representação esquemática de alvos para detecção de elementos e eventos geneticamente modificados por meio da PCR (adaptado de Holst-Jensen et al., 2003).

Métodos para detecção de OGMs devem seguir requisitos mínimos e específicos que incluem a validação *in house* e estudos interlaboratoriais a fim de que sejam validados e incorporados às análises de rotina. Neste sentido, padrões internacionais foram estabelecidos para a avaliação do desempenho de métodos analíticos de detecção e quantificação de OGMs.

Conforme o Regulamento da Comissão Européia (EC) n. 641/2004, o método deve permitir a detecção e quantificação de eventos GMs específicos no material certificado bem como em amostras de alimento e ração animal. Além disso, métodos de quantificação de OGM por PCR em tempo real, devem satisfazer diversos requisitos, tais como os estabelecidos pela Rede de Laboratórios Europeus de Análise de OGM (ENGL). De acordo com a ENGL, os critérios para PCR em tempo real incluem a eficiência da amplificação entre 90% e 110%, o que corresponde à inclinação da reta de eficiência menor que ou igual a $-3,1$ e maior que ou igual a $-3,6$; o coeficiente de correlação (R_2) maior que ou igual a 0,98, que indica a linearidade de correlação dos dados de acordo com a faixa de concentração analisada; o desvio padrão da reprodutibilidade (RSD_R) menor que 35% em relação à concentração do DNA alvo, sendo que RSD_R menor que 50% é aceitável para concentrações menores que 0,2%; o limite de quantificação (LOQ) deve

ser menor que um décimo do valor da concentração do alvo; a robustez pode apresentar um desvio de mais ou menos 30% (ENGL, 2008).

1.4 Amplificação por PCR

A PCR é um processo que mimetiza *in vitro* o processo natural de replicação do DNA que ocorre a nível celular. Contudo, a PCR amplifica um fragmento restrito e específico do DNA-molde que permite a multiplicação de sequências específicas de DNA a partir de um par de oligonucleotídeos sintéticos denominados iniciadores (LIPP et al., 2005). Na detecção de OGM, os iniciadores são artificialmente sintetizados, tendo como base uma sequência de nucleotídeos complementares às sequências que delimitam o fragmento de DNA a ser amplificado. A reação de amplificação (Figura 1.4) é catalisada pela enzima DNA polimerase que alonga o iniciador, quando este está ligado a uma fita simples de DNA-molde, e gera uma cópia complementar da sequência-alvo presente no DNA recombinante do OGM (ANKLAM et al., 2002).

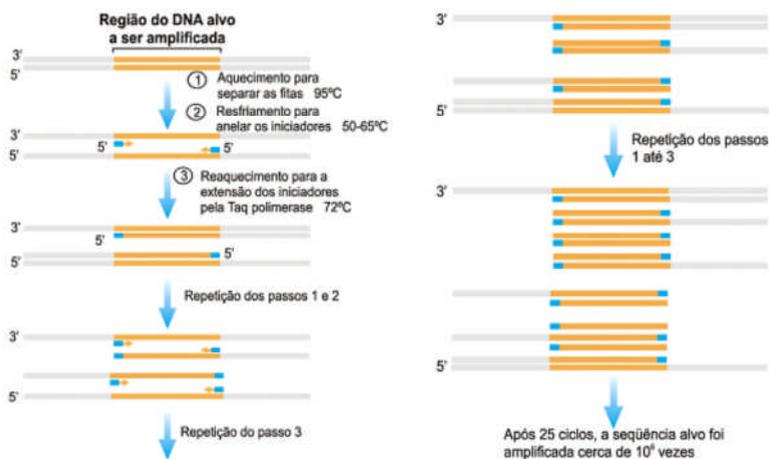


Figura 1.4 - Representação das etapas da PCR para amplificação de DNA (adaptado de Nelson, Cox, 2000).

A PCR consiste em ciclos consecutivos de desnaturação do DNA dupla fita para DNA fita simples pelo aumento da temperatura; anelamento de dois iniciadores no DNA-alvo e extensão da cadeia de DNA pela adição de nucleotídeos devido à ação da enzima DNA

polimerase na presença de íons magnésio. Isto permite a duplicação do fragmento de interesse a cada ciclo e o aumento exponencial do número de fragmentos amplificados de acordo com o número total de ciclos da reação (SOMMA; QUERCI, 2004). Qualquer método de detecção de OGM por PCR depende de um conhecimento detalhado da estrutura e da sequência do DNA recombinante a fim de selecionar os iniciadores mais apropriados. Traços de DNA são suficientes para detecção de OGM em alimentos uma vez que o que mais importa na detecção é a qualidade, a quantidade e a pureza do DNA extraído (ANKLAM et al., 2002).

O resultado da amplificação de DNA por PCR pode ser facilmente visualizado por eletroforese em gel de agarose. Quando o produto da PCR (amplicon) proveniente da amplificação do DNA recombinante estiver presente no perfil de eletroforese da amostra, o resultado indica a presença de OGM. É necessário, porém, ter cuidado com a possibilidade de resultados falso-positivos, que podem ser verificados por métodos como clivagem do produto amplificado, digestão com endonucleases de restrição, sequenciamento do produto da PCR ou realização de uma *nested* PCR onde o produto da primeira PCR é reamplificado em uma nova reação (SOMMA; QUERCI, 2004). Resultados falso-negativos também podem ser avaliados pela adição do DNA do material certificado de referência do OGM ao DNA das amostras antes da amplificação por PCR (PERMINGEAT; REGGIARDO; VALLEJOS, 2002).

1.4.1 *Nested* PCR

A técnica denominada *nested* PCR pode ser usada para aumentar a sensibilidade da reação e confirmar que a primeira PCR amplificou especificamente um fragmento presente na sequência do DNA-alvo. A *nested* PCR é realizada por 15 a 30 ciclos com um primeiro par de iniciadores e a seguir o produto da primeira PCR é reamplificado por mais 15 a 30 ciclos com um segundo par de iniciadores, para amplificar uma região interna do primeiro amplicon. O produto originado na primeira PCR é usado como um molde para a segunda PCR (Figura 1.5).

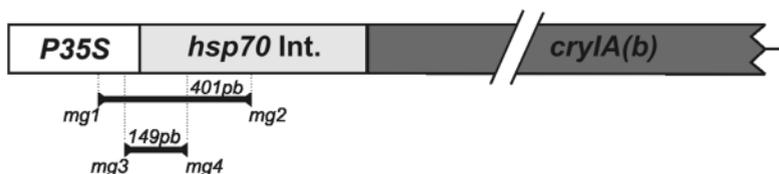


Figura 1.5 – *Nested* PCR com os iniciadores mg1/mg2 e mg3/mg4 para amplificação do DNA recombinante presente no evento de milho MON810.

O uso da *nested* PCR pode aumentar a sensibilidade e especificidade da amplificação do DNA porque elimina produtos de amplificação inespecíficos. No entanto, o risco de contaminação é uma desvantagem da maior sensibilidade e um grande cuidado deve ser tomado na realização deste tipo de reação (SOMMA; QUERCI, 2004).

1.4.2 PCR multiplex

A PCR multiplex permite a detecção de vários segmentos de DNA simultaneamente. A combinação de diversos pares de iniciadores no mesmo tubo de reação permite obter um grande número de informações em pouco tempo com economia no consumo de reagentes em relação à PCR convencional, que utiliza um único par de iniciadores (GERMINI et al., 2005). Diversos pesquisadores utilizaram PCR multiplex para detecção de milho GM (MATSUOKA et al., 2002; GERMINI et al., 2005; ONISHI et al., 2005; JAMES et al., 2009;).

Huang e Pan (2004) utilizaram iniciadores específicos para detecção simultânea dos milhos MON810 e NK603 e encontraram um limite de detecção de 0,5 %. Onishi e colaboradores (2005) utilizaram PCR multiplex para detecção de oito eventos de milho GM que incluíram Bt11, Bt176, GA21, MON810, T25, MON863, NK603 e TC1507, e comprovaram a eficiência da PCR multiplex para detecção qualitativa do milho GM.

Entretanto, o uso da análise multiplex dificulta a distinção precisa do tipo de OGM presente na amostra porque o resultado obtido pode ser interpretado de diferentes maneiras, tais como: a amostra contém um OGM específico; a amostra contém mais de uma modificação genética; a amostra contém uma pequena porção de outros grãos que possuem fragmentos de DNA idênticos àqueles inseridos no grão GM em análise; ou a PCR não pode ser realizada com certos iniciadores porque a degradação do DNA recombinante pode ser diferente de acordo com o grau de processamento do alimento (MATSUOKA et al., 2002; SONG et al., 2011).

1.4.3 PCR em Tempo Real

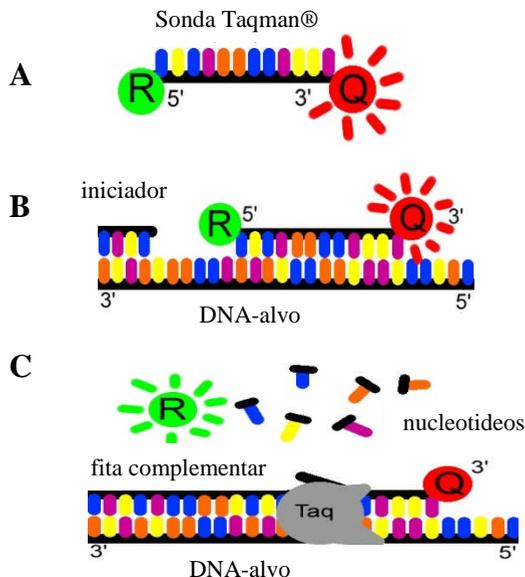
O método para quantificação de OGM em alimentos mais utilizado atualmente é a PCR em tempo real. Esse método permite

monitorar a PCR durante a sua condução, em tempo real. Os resultados geralmente são expressos em percentual de material GM em relação ao material do organismo parental (BARROS et al., 2008). Isto significa que a base para cálculo do teor de material GM deve ser o material do organismo parental, por exemplo, a referência para estimativa do conteúdo de milho GM por PCR deve ser o DNA total do milho utilizado na formulação do alimento. Os corantes intercalantes (SYBR® Green) e as sondas de hibridização (TaqMan®, FRET, Scorpion™) destacam-se entre os sistemas mais utilizados para quantificação de OGM por PCR em tempo real (LIPP et al., 2005). A PCR em tempo real permite o monitoramento da reação de amplificação em tempo real (ciclo a ciclo), em sistema fechado, sem interferências externas no progresso da reação. Um sinal fluorescente é detectado em proporção ao aumento da quantidade do produto de amplificação. Esta fluorescência é emitida por compostos fluorescentes, que podem estar ligados a sondas, como Taqman®, FRET, Scorpion™; ou intercalados na dupla fita do DNA amplificado como ocorre no sistema SYBR Green. As sondas são sequências de DNA que se ligam à região central da sequência-alvo, aumentando a especificidade do método (WISEMAN, 2002; LIPP et al., 2005).

Um dos corantes intercalantes mais utilizados é o SYBR Green I que se liga inespecificamente à dupla fita de DNA e não se liga à fita simples. Assim, o aumento da quantidade do DNA sintetizado resulta em um aumento do sinal fluorescente. A maior limitação do sistema de quantificação que utiliza o SYBR Green I é a inespecificidade, já que toda fita dupla de DNA formada é quantificada, incluindo produtos não específicos e dímeros de iniciadores. Contudo, a análise da curva de dissociação térmica característica dos produtos amplificados é uma ferramenta que auxilia na especificidade para a análise dos resultados (WEIGHARDT, 2004).

Nos sistemas que utilizam sondas de hibridização, pequenos oligonucleotídeos marcados com corantes fluorescentes hibridizam na região delimitada pelos iniciadores e ocorre aumento da especificidade da PCR. O uso das sondas fluorescentes requer uma hibridização específica entre a sonda e o alvo para que ocorra a geração do sinal fluorescente. Portanto, a ocorrência de amplificação inespecífica não produz sinal fluorescente. Além disso, as sondas podem ser marcadas com diferentes corantes *reporter*, o que possibilita a detecção de mais de uma sequência amplificada numa mesma reação (reação de *PCR multiplex*). Dentre as sondas de hibridização, as sondas TaqMan®, são as mais utilizadas na PCR em tempo real.

A sonda TaqMan® é constituída por um oligonucleotídeo de 20 a 30 bases (com temperatura de desnaturação - T_m 10°C acima da T_m dos iniciadores) marcado na extremidade 5' com um corante *reporter* fluorescente de alta energia e um corante *quencher* fluorescente de baixa



energia na extremidade 3'. Enquanto a sonda permanece intacta, a proximidade do *quencher* reduz intensamente a fluorescência emitida pelo *reporter* pela transferência de energia. Na presença do alvo, durante a fase de anelamento da PCR, a sonda se anela em uma das fitas do DNA alvo. Durante a fase de extensão, a atividade de exonuclease 5' → 3' da enzima *Taq* DNA polimerase degrada a sonda ocorrendo liberação do corante *reporter* e emissão do sinal fluorescente. A degradação da sonda da fita do DNA alvo permite a continuação da extensão do iniciador até o final (Figura 1.6). Em cada ciclo de PCR, outras moléculas do *reporter* vão sendo liberadas ocorrendo assim um aumento da intensidade da fluorescência proporcional à quantidade do produto de amplificação produzido (HEID et al., 1996).

Figura 1.6 – Representação da PCR em tempo real com sondas Taqman. (A) sonda TaqMan®, (B) anelamento dos iniciadores e da sonda com o DNA-alvo, (C) extensão do amplicon e degradação da sonda. Fonte: adaptado de

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realttimepcr.htm>

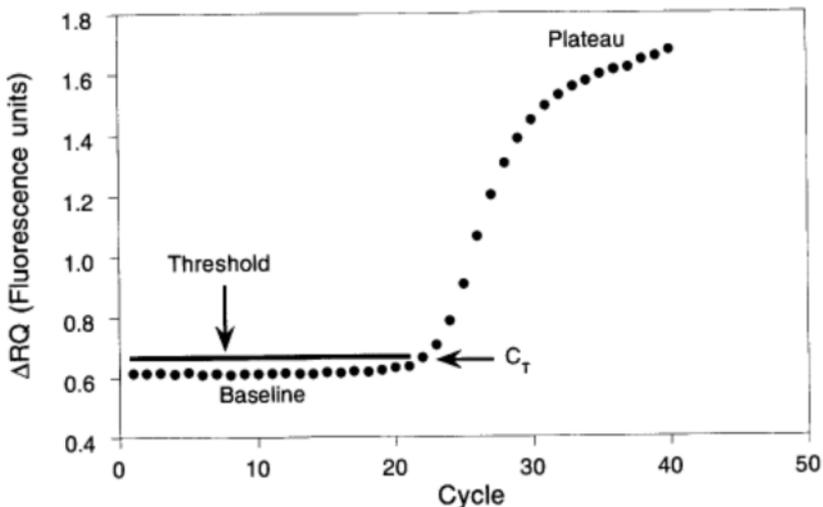
Na PCR em tempo real, é possível distinguir três fases distintas:

1ª fase: fase “lag” com flutuação correspondendo ao sinal do ruído de fundo (*background*). Nesta fase ainda não houve clivagem suficiente da sonda para liberação do corante *reporter* e para detecção da fluorescência.

2ª fase: fase exponencial, com aumento do sinal fluorescente, a quantidade de produtos de amplificação dobra a cada ciclo.

3ª fase: formação de um platô. Fase final da reação, quando não há aumento do número de produtos de amplificação.

A quantificação na PCR em tempo real ocorre na fase exponencial, onde há um acúmulo de produtos amplificados com conseqüente aumento da emissão de fluorescência. O ciclo onde o sinal fluorescente emitido ultrapassa o limiar de detecção de sinal permite inferir a concentração inicial do DNA-alvo para cada amostra. O limiar de detecção ou linha *threshold* é definido como o nível de sinal *reporter* normalizado que é usado para a determinação do C_t nos ensaios de PCR em tempo real. O *threshold* deve ser ajustado acima da linha de base, mas deve ser suficientemente baixo para se encontrar dentro da fase exponencial da curva de amplificação, no ponto em que as réplicas



sejam mais coincidentes (Figura 1.7).

Figura 1.7 - Gráfico de amplificação por PCR em tempo real (adaptado de HEID et al., 1996).

O ciclo *threshold* (Ct) é o ciclo em que a curva de amplificação do DNA alvo cruza a linha *threshold*. Quanto maior a quantidade inicial do alvo, mais cedo ocorre um aumento significativo da fluorescência e mais baixo será o valor de Ct (WEIGHARDT et al., 2004).

Esta metodologia tem sido utilizada e validada para detecção de OGMs em diversos estudos (TAVERNIERS et al., 2004; WEIGHARDT et al., 2004; FEINBERG et al., 2005; FERNANDEZ et al., 2005; CANKAR et al., 2006; BRANQUINHO et al., 2010; CORBISIER et al., 2010). Alguns sistemas de quantificação por PCR em tempo real têm sido descritos para quantificação de soja RR utilizando vários elementos genéticos como alvo, como o P35S, o TNOS, o gene *cp4epsps*, sequências presentes na construção do evento, e sequências do sítio de integração entre o inserto e o genoma da planta (VAITILINGOM et al., 1999; PAULI et al., 2001; ALARY et al., 2002; PERMINGEAT, 2002; KURIBARA et al., 2002; SHINDO et al., 2002; TERRY; HARRIS, 2002; HIRD et al., 2003; TAVERNIERS et al., 2004; HUANG; PAN, 2005; FOTI et al., 2006; CORBISIER et al., 2010).

Alary et al. (2002) comprovaram a eficiência da sonda TaqMan para análise de grãos de soja RR e milho evento Bt176 pela amplificação de um fragmento do P35S e de genes endógenos. Hernandez et al. (2004) apresentaram um método para quantificação simultânea de diferentes produtos de amplificação específicos para a soja RR e para os eventos de milho Bt176, Bt11, MON810 e GA21.

É importante comprovar a repetibilidade e a reprodutividade dos métodos de análise de GMs por meio de experimentos realizados sob condições específicas com diferentes amostras e em diferentes dias. Foi observado que além das condições da reação da PCR, fatores como sistema de extração do DNA e diferentes dias de corrida de PCR contribuem para a variabilidade dos resultados em ensaios de validação da PCR em tempo real. Nesse sentido, estudos de validação devem estabelecer uma faixa dinâmica de teste, matrizes com complexidade comparável e experimentos com duração determinada, pois todos esses fatores afetam os resultados da PCR (SCHOLTENS et al., 2010).

1.5 Quantificação relativa de OGM por PCR em tempo real

A legislação brasileira torna obrigatória a rotulagem dos alimentos e ingredientes alimentares que contenham ou sejam

produzidos a partir de OGM, com presença acima de 1% do produto (BRASIL, 2003). Nesse contexto, ingrediente alimentar é definido como toda substância, incluindo aditivos alimentares, usados na manufatura ou preparo de um produto alimentício e ainda presente no produto acabado, na forma original ou modificada (BRASIL, 2005).

Uma das questões cruciais apontadas por vários pesquisadores no desenvolvimento de métodos para a implementação da legislação é a quantificação de ingredientes GMs em termos de genes ou de moléculas (WEIGHARDT, 2007).

A maioria dos métodos disponíveis para detecção de OGMs é baseado na medida da razão DNA/DNA, que é convertida na razão massa/massa pelo uso de Materiais de Referência Certificados (CRMs) a fim de atingir o limite de detecção de alimentos GM, geralmente de 0,9 a 5%, conforme estabelecido pela legislação (RODRIGUEZ-LÁZARO et al., 2007). A medida da razão DNA/DNA pode ser determinada com precisão, contudo não há relação evidente entre o conteúdo de DNA e a massa da planta (HOLST-JENSEN et al., 2003). Além disto, a presença de diferentes OGMs em uma mesma amostra torna essa conversão ainda mais difícil (MICHELINI et al., 2008).

O estabelecimento do conteúdo relativo de um OGM em um produto com base na razão peso/peso do ingrediente implica na suposição de que existe uma proporcionalidade direta entre o peso do ingrediente e o número total de genes/genoma contido nele. Entretanto, tal proporcionalidade não existe devido à flutuação do valor de *IC-value* (quantidade de DNA presente no genoma haplóide de determinada espécie) entre as variedades e à incerteza na correlação entre o peso do ingrediente e o peso do DNA. Portanto, a real quantificação de sequências GM *versus* ingrediente analisado pode variar muito, principalmente em função da ploidia, se o evento é homocigoto ou heterocigoto e do número de inserções do genoma (WEIGHARDT, 2006).

Além desses fatores de variação, ainda deve ser considerado que os grãos GM e os não-GM, que compõem o alimento, podem apresentar diferentes tamanhos de células devido a diferenças no conteúdo relativo de água que varia em função das formas de cultivo, colheita e secagem dos grãos ou que o conteúdo de DNA de cada célula difere devido a diferenças genéticas. Isso pode criar uma considerável lacuna entre a unidade legal de medida, o peso, e a unidade analítica de medida, o número de cópias de DNA (HOLSTEN-JENSEN; BERDAL, 2004).

Na quantificação por PCR em tempo real, o conteúdo de OGM em uma amostra é expresso como a quantidade de material GM em relação à quantidade de um gene ou de uma sequência endógena específico da espécie, calculado em termos de genoma haplóide. O gene endógeno deve ser escolhido de modo a ser espécie-específico; presente em uma única cópia por genoma haplóide; presente de forma estável nas diversas linhagens de uma espécie de planta, e amplificado com a mesma eficiência do gene inserido na planta. Contudo, no caso de alimentos processados e constituídos por vários ingredientes derivados da mesma espécie, tais como farinha de milho e amido de milho, os métodos baseados na análise do DNA não são capazes de distingui-los e eles serão dosados como um único ingrediente, o que pode acarretar numa estimativa superior ou inferior do conteúdo de OGM na amostra (WEIGHARDT, 2007).

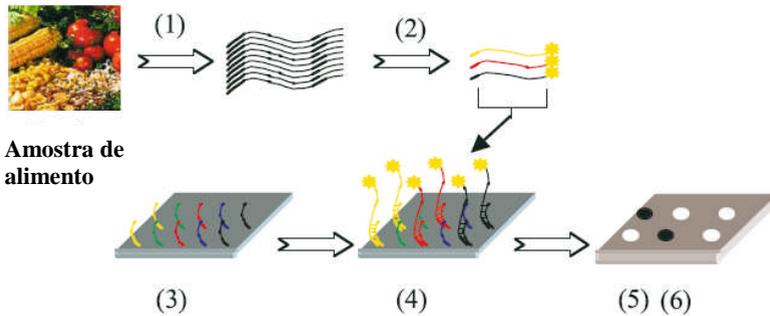
De fato, a quantificação do conteúdo GM em uma amostra não fornece a real dosagem molecular das modificações, número de genomas haplóides modificados versus número total de genomas haplóides, nem o conteúdo definido baseado na legislação. Ao invés disso, fornece uma dosagem relativa do gene determinada em relação ao CRM empregado.

A quantificação do teor de OGM numa amostra pode ser feita pela quantificação do número de cópias de cada alvo separadamente ou pelo método ΔC_t , calculado pela diferença entre os C_t s dos dois alvos. Na quantificação do número de cópias são preparadas duas curvas separadamente por meio de diluições seriadas do CRM levando em consideração a eficiência de amplificação dos diferentes alvos (CANKAR et al., 2006).

As quantidades do gene endógeno e do gene GM são determinadas por interpolação com as respectivas curvas analíticas. O conteúdo do OGM (percentual) é calculado pela razão entre a quantidade do alvo geneticamente modificado e a quantidade do alvo endógeno, conforme a fórmula: $\% OGM = (alvo\ GM / alvo\ endógeno) \times 100$.

1.6 Métodos de multidetecção de OGMs

O crescente número de eventos GM aprovados para plantio e comercialização gera a necessidade de desenvolver sistemas de rotina para detecção simultânea de diversos OGMs em uma mesma reação. Neste sentido, recentemente foram desenvolvidas estratégias de multidetecção de OGMs. Um método bastante utilizado está baseado na



pré-amplificação por PCR seguida pela ligação dos amplicons em microarranjos, sondas de DNA imobilizadas em suporte de vidro, com alvos pré-definidos (Figura 1.8). A seguir, um modelo matemático, algoritmo, é utilizado para comparar o padrão dos alvos amplificados com os elementos presentes no evento GM a fim de apontar ou identificar o(s) evento(s) presente(s) na amostra. Esse método foi aplicado para detecção de 3 eventos de milho e 1 de soja GM pela amplificação de 14 alvos específicos e permitiu a detecção de amostras que continham 0,1% de OGM com 95% de precisão (LEIMANIS et al., 2008).

Figura 1.8 – Princípio da análise de multidetecção. (1) extração do DNA da amostra, (2) amplificação do DNA por PCR com iniciadores específicos e marcação dos amplicons com biotina, (3) sondas complementares às sequências amplificadas são imobilizadas em lâmina de vidro, (4) o produto amplificado é colocado sobre a lâmina para que os amplicons se liguem com suas sondas complementares, (5) após etapas de lavagem, as sequências biotinizadas ligadas à sonda são detectadas por técnicas colorimétricas (por exemplo, precipitação com sais de prata), (6) comparação do padrão de ligação (Leimanis et al., 2006).

Também foram testados 31 diferentes iniciadores e sondas para detecção de milho, soja e arroz por PCR com microarranjos. Neste mesmo estudo, os resultados da PCR foram plotados em uma planilha matemática com o uso de programa computacional específico, sendo possível estimar a presença de eventos GM aprovados e não aprovados (MANO et al., 2009).

Querci et al. (2009) desenvolveram um sistema de multidetecção de OGM por PCR em tempo real que permite a identificação simultânea de 39 eventos GMs pelo uso de iniciadores e sondas específicos distribuídos em placas de PCR com 96 poços. As placas de PCR estão prontas para o uso e contêm iniciadores e sondas

liofilizados que permitem a detecção de eventos de milho, algodão, arroz, canola, soja, beterraba e batata. Estudos interlaboratoriais mostraram que a especificidade, a eficiência e o limite de detecção deste sistema estão de acordo com as exigências para métodos de detecção de OGM e ele pode ser utilizado em análise de rotina (QUERCI et al., 2009). O sistema *Dual® Chip GMO PCR* que já foi validado para identificação de 9 elementos genéticos, 4 genes endógenos de diferentes espécies, 1 gene universal para plantas e 1 sonda específica para o P35S como controle da contaminação de plantas pelo promotor do gene *camv* do vírus do mosaico da couve-flor; permite a identificação de diversos eventos de milho e soja que apresentem o gene *cryIA(b)* e *epsps* (HAMELS et al., 2009).

Outras estratégias promissoras para a multidetecção de OGMs com uso de microarranjos ainda precisam ser validadas e avaliadas quanto ao custo e complexidade. Destacam-se estudos com resultados bem-sucedidos para o uso de sondas *padlock* (PRINS et al., 2008); NAIMA, método quantitativo baseado na amplificação de sequências de DNA implementado com microarranjo (MORISSET et al., 2008); e tecnologia Luminex x MAP, comercialmente disponível para detecção de sequências específicas de DNA com distinção de até 100 cores distintas para diferentes alvos e sondas fluorescentes (FANTOZZI et al., 2008).

Outros estudos mostram a associação da amplificação por PCR com a análise em gel de eletroforese capilar que permitiram a detecção de 5 novos eventos de milho GM e de 24 alvos de DNA com limite de detecção de 0,1% (HOLCK et al., 2010; GUO et al., 2011). Plasmídios com diferentes alvos de detecção são usados como calibrantes para identificar e quantificar diversos elementos presentes em plantas GM, a exemplo de um plasmídio desenvolvido com oito alvos para rápida identificação de elementos presentes em eventos de soja e algodão GM (WANG et al., 2011).

1.7 Desafios e perspectivas na análise de alimentos GM

O aumento no número de OGMs disponíveis com diferentes características, genes e elementos de construção representa um desafio para o desenvolvimento de metodologias de análise de alimentos GMs. Diversas estratégias foram propostas para triagem de amostras com conteúdo de OGM desconhecido, por exemplo: tabelas de frequência que relacionam a presença de elementos e genes com eventos GMs específicos (WAIBLINGER et al., 2010); triagem por PCR em tempo

real com SYBR Green®, chamado CoSYPS (VAN DEN BULCKE et al., 2010; MBELLA et al., 2011); algoritmo para otimização das estratégias de triagem de OGMs, chamado *GMOTrack* (NOVAK et al., 2009). Todas estas estratégias envolvem o uso de um sistema de informações computadorizado para gerar decisões durante o processo de análise de OGMs, desde a escolha do método até a interpretação final dos resultados obtidos. Sistemas de multidetecção que incluem placas prontas para PCR em tempo real, microarranjos (*padlocks*, *DNA-chips*), amplificação seguida por detecção em eletroforese capilar ou sistema de fluorescência Luminex x MAP são as alternativas atualmente testadas a fim de permitir a identificação de diferentes OGMs. Contudo, qualquer técnica de PCR multiplex está limitada e sujeita a resultados falso-positivos se mais de 5 ou 10 alvos estiverem combinados na mesma reação. Além disso, essa técnica envolve o uso de equipamentos e reativos de alto custo e também exige pessoas tecnicamente qualificadas (QUERCI et al., 2009).

Métodos de microarranjos são alternativas promissoras para multidetecção que ainda necessitam validações para uso em análise de rotina. Contudo, a PCR em tempo real ainda é a estratégia mais utilizada e mais adequada para análise de OGMs (QUERCI et al., 2009).

A norma ISO 17025 exige a validação de todos os métodos usados na análise de OGMs. Neste sentido, a validação de métodos de multiplex exige muito tempo e esforço para validar individualmente todos os iniciadores e sondas para diferentes alvos e concentrações. Assim, é importante definir critérios de avaliação ao invés de definir métodos de validação individual (QUERCI et al., 2010).

O estabelecimento de bases de dados contendo as modificações genéticas de diferentes eventos GM bem como métodos oficiais disponíveis para análise e interpretação dos resultados são ferramentas importantes para a escolha e combinação de estratégias que serão usadas em testes de rotina. Em linhas gerais, os seguintes critérios podem ser utilizados na escolha das estratégias de análise de OGMs: desempenho do método em testes de proficiência e na identificação de amostras reais; flexibilidade em relação à detecção de novos alvos e eventos; aplicabilidade em função da compatibilidade com estratégias de detecção atuais; custo em termos de reagentes e equipamentos necessários e a conformidade com normas e padrões internacionais. Outros fatores importantes que devem ser considerados são a legislação vigente; a aplicabilidade do método para a matriz da amostra que será analisada, como grãos, produto in natura ou processado; a

disponibilidade de CRMs para a amostra; a validação do método escolhido (QUERCI et al., 2010).

A combinação de base de dados com informações oficiais e atualizadas, métodos analíticos de alto desempenho e modelos matemáticos para análise dos resultados é uma solução eficiente para o monitoramento do crescente número de eventos GMs disponíveis (QUERCI et al., 2010).

A validação de métodos também envolve a medida de incertezas que afetam o resultado final da análise. No caso da quantificação de OGMs por PCR em tempo real, as fontes de incerteza que devem ser consideradas significativas são: o procedimento amostral, que deve garantir a representatividade e homogeneidade da amostra; a etapa de extração de DNA, que é essencial para obtenção de DNA molde amplificável; a estabilidade e conservação dos CRMs; o software e a seleção de parâmetros para a análise por PCR em tempo real, principalmente em estudos interlaboratoriais que realizam a mesma análise (BURNS; VALDIVIA, 2007).

É importante conhecer a sequência realmente inserida no evento GM uma vez que a modificação genética pode gerar a deleção, o rearranjo e/ou a substituição de parte do genoma da célula. Outra questão é se sementes comerciais são homocigotas ou heterocigotas bem como diferenças na quantificação de múltiplos eventos de acordo com a forma de produção/obtenção da planta que pode ser através de um único evento, múltiplos eventos ou pelo cruzamento de dois ou mais eventos transformados. Variações no conteúdo relativo de DNA também ocorrem devido a diferentes variedades bem como pela origem parental do evento GM e pela parte vegetal utilizada, como folha, flor, endosperma, embrião, casca ou grão inteiro (HOLST-JENSEN et al., 2006).

De acordo com a Comissão Européia, os resultados da análise quantitativa devem ser expressos como a porcentagem do número de cópias do DNA do evento GM em relação ao número de cópias do alvo específico do DNA calculado em termos do número haplóide de genomas. A maioria dos grãos é poliplóide de espécies selvagens. Por exemplo, o genoma haplóide do trigo ($n = 3x = 21$) é composto de três genomas monoplóides ($n = x = 7$). Consequentemente, a interpretação do termo “genoma haplóide” tem um impacto altamente significativo na forma de quantificação de OGMs. A concentração do material GM deve ser expressa como a razão de uma sequência evento-específica em relação a um gene de referência espécie-específico em termos do genoma haplóide (EUROPEAN COMMISSION, 2004b). Esta razão

precisa ser estabelecida para cada gene e para cada espécie. Assim, a avaliação baseada no genoma haplóide é uma alternativa coerente e consistente (HOLST-JENSEN et al., 2006).

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Aplicar as técnicas de PCR e PCR em tempo real para detecção de variedades GM em alimentos comercializados no Brasil e desenvolver metodologia para detecção por PCR em tempo real dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*.

Objetivos específicos:

- detectar, por PCR, os eventos de milho GM Bt11 e Bt176 em amostras de alimentos derivados de milho (farinha de milho, fubá, biju e polenta) a fim de monitorar os produtos disponíveis no mercado brasileiro quanto a presença de OGMs;
- monitorar o conteúdo de OGM e a rotulagem de derivados cárneos e produtos à base de soja por PCR para detecção de soja RR e PCR em tempo real para quantificação das amostras positivas;
- desenvolver iniciadores e sondas para PCR em tempo real para detecção e rastreabilidade de OGMs contendo os elementos *cry1A.105* e *cry2Ab2*.

CAPÍTULO 2

MONITORAMENTO DO MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO BT11 E BT176 EM ALIMENTOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL DE 2005 A 2007

Artigo publicado:

DINON, A.Z.; BOSCO, K.T.; ARISI, A.C.M. Monitoring of Bt11 and Bt176 genetically modified maize in food sold commercially in Brazil from 2005 to 2007. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 90, n.9, p.1566-69, 2010.

2. Monitoramento do milho geneticamente modificado Bt11 e Bt176 em alimentos comercializados no Brasil de 2005 a 2007

Artigo publicado - *Journal of the Science of Food and Agriculture*
vol. 90, n.9, p.1566-69, 2010, DOI: 10.1002/jsfa.3980

Andréia Zilio Dinon, Kenia Tavares Bosco,
Ana Carolina Maisonnave Arisi

Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

Resumo:

As primeiras variedades de milho geneticamente modificado (T25, MON810, Bt11, NK603 e GA21) foram aprovadas para comércio no Brasil a partir de 2007. Neste estudo, o método da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi empregado para monitorar a presença do milho Bt11 e a *nested* PCR foi usada para detectar a presença do milho Bt176 em 81 produtos derivados de milho (farinha de milho, fubá, biju e polenta) comercializados no Brasil de 2005 a 2007. O limite de detecção da PCR para o Bt11 foi 10 g.kg⁻¹ e para a *nested* PCR do Bt176 foi 1 g.kg⁻¹. As variedades Bt11 e Bt176 não foram detectadas nas 81 amostras de alimentos derivados de milho comercializado no Brasil de 2005 a 2007, antes da liberação comercial do milho GM no Brasil. Estas indústrias brasileiras estavam de acordo com as regras estipuladas pela legislação vigente com respeito à rotulagem de OGMs.

Palavras-chave: OGM, milho; Bt11; Bt176; *nested* PCR.

2.1 Introdução

O milho geneticamente modificado (GM) é a segunda planta mais cultivada no mundo e atualmente ocupa uma área de 37,3 milhões de hectares o que corresponde a 30% da área global para cultivo de plantas (JAMES, 2008). Eventos de milho GM são avaliados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) para comercialização no Brasil. Os eventos de milho T25, MON810 e Bt11 foram aprovados em dezembro de 2007, e NK603, GA21 e TC1507 em 2008 (CTNBio (<http://www.ctnbio.gov.br>)). Estes eventos GM já são liberados comercialmente em outros países da América do Sul, inclusive na Argentina (AGBIOS (<http://www.agbios.com/dbase.php>)). O milho Bt é a planta GM mais cultivada no mundo (JAMES, 2008). Em 2003, o governo brasileiro emitiu o Decreto 4.680, que exige que todos os alimentos para consumo humano com conteúdo igual ou superior a 1% (10g.kg^{-1}) de organismos geneticamente modificados (OGM) devem apresentar essa informação no rótulo (BRASIL, 2003). Este regulamento foi aprovado antes da liberação comercial de eventos de milho GM no Brasil. Consequentemente, a fim de cumprir com a legislação brasileira, é necessário monitorar a presença de eventos GM aprovados e não aprovados no mercado. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é o sistema analítico mais utilizado para detecção de OGM devido a sua alta sensibilidade e especificidade para amplificação do DNA (ANKLAM et al., 2002). Além disso, PCR é geralmente usada para detecção de material GM em análises de rotina (HOLST-JENSEN, 2009; LEE, YI, KIM, 2009). O objetivo deste trabalho foi detectar a presença dos eventos de milho GM Bt11 e Bt176 em 81 amostras de alimentos contendo milho (farinha de milho, fubá, biju e polenta) disponíveis no mercado brasileiro.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Amostras

O total de 81 produtos a base de milho, incluindo 18 amostras de farinha de milho, 27 de fubá, 13 de biju e 23 de polenta (farinha de milho pré-cozida), foram adquiridas em supermercados do estado de Santa Catarina, Brasil, de 2005 a 2007. Um total de 14 marcas brasileiras diferentes foi analisado. As amostras brasileiras pesavam 1 kg cada uma, com exceção das amostras de polenta que pesavam 500 g cada. Uma amostra argentina de farinha de milho (700 g) foi adquirida na província de Misiones, Argentina. Material de referência certificado pelo *European Reference Materials* (ERM), Geel, Bélgica (1 g.kg⁻¹, 10 g.kg⁻¹ e 50 g.kg⁻¹, ERM-BF412 para o evento de milho GM Bt11 e ERM-BF411 para o evento de milho GM Bt176) foram usados como controles positivos. Sementes de milho convencional (não GM) foram usadas como controle negativo. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em moinho analítico e a seguir foram estocadas a -20°C.

2.2.2 Extração de DNA

O DNA foi isolado a partir de 0,1 g das amostras trituradas pelo método de extração com brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) (LIPP et al., 1999). Cem miligramas da amostra foram misturadas com 800 µL de tampão de extração CTAB e 0,5 mg/mL de proteinase K foi adicionada. Após incubar a 64°C por 45 min, a solução foi incubada com RNase A à 0,25 mg/mL a 64°C por 10 min. Após centrifugação por 10 min a 13000 g, 500 µL de clorofórmio foi adicionado ao sobrenadante. Após uma nova centrifugação, a fase aquosa foi misturada com 500 µL de clorofórmio e o mesmo procedimento foi repetido 2 vezes. A fase aquosa foi misturada com dois volumes de CTAB a 5 g/L e NaCl a 0,04 M e incubada a temperatura ambiente por 1 h. Após centrifugar por 5 min a 13000 g, o sobrenadante foi descartado e 350 µL de NaCl a 1,2 M foi adicionado para dissolver o precipitado. A seguir foi também adicionado 350 µL de clorofórmio. Após a centrifugação, a fase aquosa foi misturada com 0,6 volumes de isopropanol em temperatura ambiente. Após a centrifugação por 4 min a 13000 g, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente, diluído em 40 µL de TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH

8,0). Cada amostra foi extraída em duplicata e/ou triplicata. A concentração e a pureza do DNA extraído foram estimadas por espectrofotômetro a 260 e 280 nm (Hitachi U1800 e U2010, Hitachi High-Technologies, Tóquio, Japão).

2.2.3 Condições da PCR

O par de iniciadores ZEO1/ZEO2, que permitem amplificar o fragmento de 329 pb do gene específico da zeína, foi usado para detectar o DNA amplificável do milho. Os iniciadores CRYIA1/CRYIA2 e CRYIA3/CRYIA4 permitem amplificar um fragmento de 420 pb e de 189 pb, respectivamente, para detecção específica do milho Bt176 por *nested* PCR (CARDARELLI et al., 2005). O par de iniciadores IVS-2/PAT-B permite amplificar um fragmento de 189 pb para identificação do milho Bt11 (GREINER; KONIETZNY; VILLAVICENCIO, 2005). Todos os iniciadores usados estão descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Iniciadores usados para detecção qualitativa do milho convencional e dos eventos de milho GM Bt176 e Bt11.

Alvo	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Especificidade	Tamanho (pb)
zeina	ZEO1	TGCTTGCATTGTTTCGCTCTCCTAG	milho	329
	ZEO2	GTCGCAGTGACATTGTGGCAT		
cry1A(b)	CRYIA1	CGGCCCCGAGTTCACCTT	milho Bt176	420
	CRYIA2	CTGCTGGGGATGATGTTGTTG		
cry1A(b)	CRYIA3	CCGCACCCTGAGCAGCAC	milho Bt176	89
	CRYIA4	GGTGGCACGTTGTTGTTCTGA		
ivs/pat	IVS2-2	CTGGGAGGCCAAGGTATCTAA T	milho Bt11	189
	PAT-B	GCTGCTGTAGCTGGCCTAATC T		

Reações de amplificação foram realizadas num volume final de 25 μL contendo tampão PCR 1X (20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl_2 , 160 μM de cada dNTP (200 μM quando os iniciadores ZEO1/ZEO2 foram usados), 0,5 μM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase (PromegaTM, Madison, WI, USA) e 2 μL do DNA molde (50 ng por reação). Após a amplificação com os iniciadores CRYIA1/CRYIA2, 2 μL do produto da PCR foi usado como molde para a *nested* PCR com os iniciadores CRYIA3/CRYIA4. Os iniciadores foram sintetizados pela IDT (Coralville, IA, EUA).

As amplificações foram realizadas no MinicyclerTM (MJ Research Inc. Watertown, MA, USA) com os seguintes programas. Para os iniciadores ZEO1/ZEO2: desnaturação por 3 min a 95°C, seguida por 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C e extensão final de 7 min a 72°C. Para os iniciadores CRYIA1/CRYIA2 e CRYIA3/CRYIA4: desnaturação por 3 min a 95°C, seguida por 25 ciclos (CRYIA1/CRYIA2) e 35 ciclos (CRYIA3/CRYIA4) de 40 seg a 95°C, 40 seg a 64°C, 40 seg a 72°C e extensão final 3 min a 72°C. Para os iniciadores IVS-2/PAT-B: desnaturação por 10 min a 95°C, seguida por 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 64°C, 30 seg a 72°C e extensão final 7 min a 72°C. A sensibilidade da *nested* PCR foi avaliada utilizando concentrações decrescentes de DNA (ajustado para 25 ng/ μL) do material de referência certificado Bt11 e Bt176 diluídos 10X em água ou em DNA (25 ng/ μL) de amostras não-GM.

2.2.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão TBE 1X (Tris-base, ácido bórico, EDTA 0,5 M, pH 8,0) a 400 mA e voltagem constante de 80 V por 30 min em mini sub cell GT ou sub cell GT (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA). A visualização foi realizada através de transiluminador UV e as imagens foram capturadas com câmera digital Canon Powershot A70 (Canon Inc., Tóquio, Japão).

2.3 Resultados e Discussão

O método CTAB foi adequado para a extração de DNA amplificável para todas as amostras. A amplificação com os iniciadores ZEO1/ZEO2 foi usada para detecção do fragmento de 329 pb do gene específico da zeína do milho (Dinon, 2007). Todas as amostras de milho apresentaram amplificação do gene da zeína e demonstraram que o

método CTAB foi apropriado para extração de DNA amplificável a partir de diferentes matrizes alimentares (GRYSON; MESSENS; DEWETTINCK, 2004; OLEXOVÁ; DOVICOVICOVÁ; KUCHTA, 2004). Este fragmento foi ausente no controle negativo sem DNA molde (NTC, *non-template control*) e no DNA de soja usado como controle negativo e esses resultados confirmam a ausência de contaminação na PCR e no processo de extração do DNA. Passos individuais de PCR foram realizados separadamente em diferentes salas a fim de evitar a contaminação cruzada das amostras e dos reagentes. Controles positivos e negativos, incluindo a reação com água ao invés de DNA, foram usados para garantir a precisão dos resultados (HUBNER; STUDER; LUTHY, 1999).

Na *nested* PCR realizada com os iniciadores CRYIA1/CRYIA2 e CRYIA3/CRYIA4, material de referência certificado como milho Bt176 (1 g.kg⁻¹, 10 g.kg⁻¹, 50 g.kg⁻¹) apresentou a amplificação do fragmento esperado de 189 pb. A amostra argentina foi positiva para a presença do milho Bt176. Todas as amostras brasileiras e o material de referência certificado para o milho Bt11 demonstraram ausência de amplificação do fragmento de 189 pb do milho Bt176. Na PCR realizada com o par de iniciadores IVS-2/PAT-B, o material de referência certificado como milho Bt11 (10 g.kg⁻¹ e 50 g.kg⁻¹) apresentou a amplificação do fragmento esperado. Todas as 81 amostras brasileiras, a amostra argentina e o material de referência certificado como milho Bt176 foram negativos para a presença do milho Bt11. A amplificação de 17 amostras está apresentada na Figura 2.1. Para as outras amostras os dados não foram apresentados.

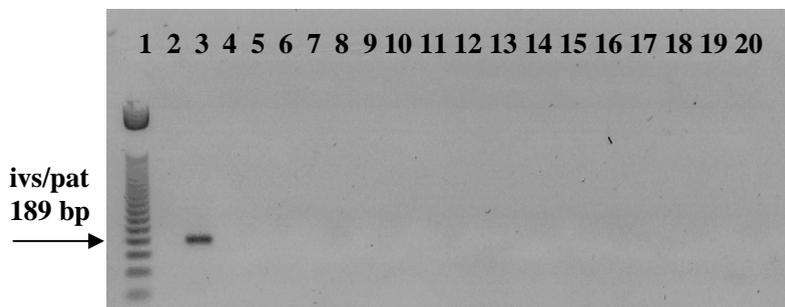


Figura 2.1 - PCR para detecção do milho Bt11 com os iniciadores IVS2/PATB. Canaletas: 1 – padrão DNA de 50 pb, 2 – controle negativo (NTC), 3 – milho Bt11 (10 g.kg^{-1}), 4 a 20 – amostras de milho ($25 \mu\text{L}$ do produto da PCR + $3 \mu\text{L}$ do tampão de carga por canaleta).

Para avaliar o limite de detecção dos eventos GM Bt176 e Bt11, o DNA extraído do material de referência do evento Bt176 (10 g.kg^{-1} e 1 g.kg^{-1}), ajustado para $25 \text{ ng}/\mu\text{L}$, foi dez vezes diluído em água ultra pura por diluições seriadas (10 , 10^2 , 10^3) e amplificado por PCR. Estes níveis de concentração foram escolhidos de acordo com o limite de detecção esperado e proposto no estudo de Zimmermann et al. (1998). O fragmento amplificado de 189 pb do Bt176 foi claramente detectado quando o material de referência certificado 1 e 10 g.kg^{-1} foi amplificado e o mesmo fragmento foi ausente em todas as diluições seriadas exceto quando o material de referência Bt176 10 g.kg^{-1} foi dez vezes diluído (Figura 2.2).

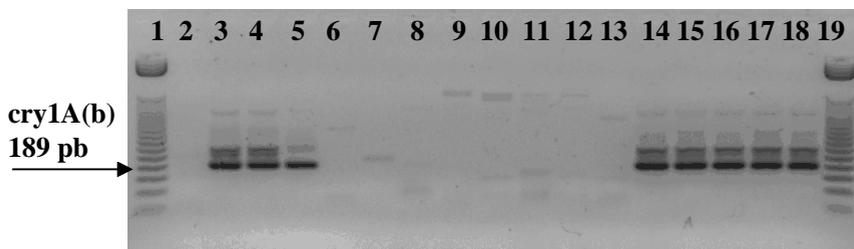


Figura 2.2 - Sensibilidade da nested PCR para detecção do milho Bt176 usando quantidade constante de DNA geneticamente modificado (GM) em amostras não GM (1:10, v/v). Canaletas: 1 – padrão de DNA de 50pb, 2 – controle negativo (NTC), 3 a 5 – milho Bt176 (50, 10 e 1 g.kg⁻¹, respectivamente), 6 a 8 – diluição seriada do DNA milho Bt176 em água (1:10, 1:100 e 1:1000 v/v, respectivamente), 9 a 13 – milho Bt176 1 g.kg⁻¹ adicionado ao DNA não GM (1:10, v/v) de grão de milho, fubá, farinha de milho, polenta e biju, respectivamente, 14 a 18 – milho Bt176 10 g.kg⁻¹ adicionado ao DNA não GM (1:10, v/v) de grão de milho, fubá, farinha de milho, polenta e biju, respectivamente, 19 – padrão de DNA de 50 pb (25 µL do produto da PCR + 3 µL do tampão de carga por canaleta).

O fragmento para o Bt11 foi sempre detectado quando o material de referência a 10 g.kg⁻¹ foi amplificado. Entretanto, o fragmento para o material de referência Bt11 (1 g.kg⁻¹) nem sempre foi visualizado em gel de agarose, representando um limite de detecção de 10 g.kg⁻¹ para o Bt11 nessas condições de PCR. O número de cópias no genoma do milho é de aproximadamente 36000 por 200 ng de DNA (HUBNER et al., 2001) ou 9000 cópias por 50 ng, correspondendo ao limite de quantificação de 90 cópias para o milho Bt11 (10 g.kg⁻¹) e 9 cópias de milho Bt176 (1 g.kg⁻¹). A fim de determinar o limite de detecção de um método, o número de cópias de OGM na menor diluição da amostra analítica deve ser de aproximadamente 20 cópias, porque isso garante boa probabilidade estatística de que todas as repetições contêm quantidade relevante de DNA (KAY; VAN DEN EEDE, 2001). Estes dados estão de acordo com o limite de detecção de OGM de 10 g.kg⁻¹ que foi encontrado para o milho Bt11 em nosso trabalho.

Uma forma de confirmar que um resultado negativo não é um falso negativo induzido por inibidores de PCR é a adição de DNA GM na amostra de DNA convencional em um experimento paralelo (PERMINGEAT; REGGIARDO; VALLEJOS, 2002). Quatro diferentes amostras (farinha, fubá, biju e polenta) que apresentaram resultados

negativos na PCR para a detecção do milho Bt11 e Bt176 foram analisadas. Cinquenta nanogramas de DNA do milho Bt11 (material certificado 1 g.kg⁻¹ e 10 g.kg⁻¹) foram individualmente adicionados em 18 µL de DNA (25 ng/µL) de cada amostra não GM e a PCR foi realizada para detecção de Bt11. O mesmo procedimento foi realizado para a detecção do Bt176 a partir do material certificado 1 g.kg⁻¹ e 10 g.kg⁻¹. Nenhum resultado positivo foi encontrado em diluições contendo 1 g.kg⁻¹ de Bt11 e Bt176 diluído em DNA de amostra não GM. Contudo, todas as amostras contendo 10 g.kg⁻¹ de DNA de CRM GM adicionado sempre apresentaram a amplificação do fragmento esperado (Figura 2.2). Estes resultados concordam com os de outros estudos (ZIMMERMANN et al., 1998, DINON; MELO; ARISI, 2008), indicando que a presença de DNA de milho de amostra não GM não modificou o limite de detecção nas condições usadas e os resultados negativos da PCR não foram falso negativos (resultados não apresentados).

Atualmente, observa-se um aumento na importância da detecção de OGMs em alimentos disponíveis no comércio, conforme observado na literatura em trabalhos desenvolvidos no Brasil (CARDARELLI et al., 2005; GREINER; KONIETZNY; VILLAVICENCIO, 2005; BROD e ARISI, 2007; BROD et al., 2007; BROD e ARISI, 2008; DINON; MELO; ARISI, 2008; GREINER e KONIETZNY, 2008), na Argentina (MARGARIT et al., 2006), no Egito (ORABY; HASSAN; MOSSALLAM, 2005), na África do Sul (VILJOEN; DAJEE; BOTHA, 2006; BOTHA e VILJOEN, 2009), na Coreia (LEE et al., 2009), na Sérvia (TASKI-AJDUKOVIC et al., 2009), na Hungria (UJHELYI et al., 2008), na China (ZHOU et al., 2007), na Polônia (KWIA TEK; SIERADZKI; MAZUR, 2007), na Malásia, no Vietnã (TUNG NGUYEN et al., 2008) e no México (QUIRASCO et al., 2008). A presença de eventos de milho GM no mercado argentino foi analisada em 32 alimentos comercialmente disponíveis e oito apresentaram resultados positivos para a proteína Cry1A(b), incluindo polenta e farinha de milho. A respeito da presença de eventos de milho GM no mercado brasileiro, existem três trabalhos sobre a detecção do evento de milho GM Bt11, Bt176 e MON810 (CARDARELLI et al., 2005; DINON, MELO, ARISI, 2008; GREINER & KONIETZNY, 2008). Nosso trabalho anterior analisou 81 amostras de alimentos brasileiros adquiridas de 2005 a 2007 e nenhuma delas foi positiva para presença do evento de milho GM MON810 (DINON, MELO, ARISI, 2008). Greiner e Konietzny (2008), analisaram 100 amostras de alimentos brasileiros contendo milho adquiridas entre 2000

e 2005, 8-11% apresentaram material derivado de eventos de milho GM, 4-6% continham mais de 10 g.kg^{-1} (1%) de milho GM, e os eventos de milho GM Bt11 e MON810 foram identificados como predominantes nestes produtos. Cardarelli e colaboradores (2005) analisaram 40 alimentos brasileiros derivados de milho coletados entre 2001 e 2003 e nenhum deles confirmou a presença dos eventos de milho GM MON810, nem Bt176.

Diferente dos resultados de Greiner e Konietzny (2008), mas de acordo com os resultados de Cardarelli e colaboradores (2005), nossos resultados confirmam que nenhuma quantidade significativa de milho GM MON810 (DINON; MELO; ARISI, 2008), Bt11 e Bt176 foi encontrada no mercado brasileiro de 2005 a 2007, antes da liberação comercial do milho GM no Brasil. Greiner e Konietzny (2008) explicam as diferenças observadas no estudo de Cardarelli e colaboradores (2005) pela origem dos produtos analisados neste estudo, uma vez que a maioria dos alimentos positivos para a detecção de eventos de milho GM não era produzida no Brasil, mas eram produtos importados. Em nosso estudo, todas as amostras de produtos brasileiros foram produzidas no Brasil, por 14 marcas diferentes, e todas as amostras foram negativas para a presença dos eventos de milho GM Bt176 e Bt11, contudo, a amostra argentina foi positiva para a presença do evento de milho GM Bt176. Uma vez que os eventos de milho GM Bt11 e Bt176 foram aprovados para comércio no Brasil apenas em dezembro de 2007, a ausência dos eventos de milho GM Bt11 e Bt176 em alimentos produzidos no Brasil era esperada. Além disso, nossos resultados indicaram que os produtores brasileiros estavam de acordo com a legislação vigente para alimentos GM.

2.4 Conclusão

As variedades de milho GM Bt11 e Bt176 não foram detectadas por PCR específica em 81 amostras de alimentos derivados de milho comercializados no Brasil de 2005 a 2007, antes da liberação comercial de eventos de milho GM no Brasil. Estas indústrias brasileiras de alimentos estavam de acordo com as regras estabelecidas na legislação vigente com respeito ao comércio de alimentos GMs no Brasil.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil (edital CNPq/MAPA/DAS 064/2008) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina, FAPESC, Brasil. AZD foi bolsista do CNPq, Brasil. KTB foi bolsista da FAPESC, Brasil. Agradecemos à colaboração de Maria Regina Branquinho e Paola Cardarelli na discussão desse trabalho.

CAPÍTULO 3

MONITORAMENTO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS EM DERIVADOS CÁRNEOS E PRODUTOS À BASE DE SOJA COMERCIALIZADOS NO BRASIL DE 2007 A 2008

Artigo Publicado:

DINON, A.Z.; TREML, D.; MELLO, C.S.; ARISI, A.C.M. Monitoring of GMO in Brazilian processed meat and soy-based products from 2007 to 2008. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 23, p. 226–229, 2010.

3. Monitoramento de organismos geneticamente modificados em derivados cárneos e produtos à base de soja comercializados no Brasil de 2007 a 2008

**Artigo Publicado – *Journal of Food Composition and Analysis*
vol. 23, p. 226–229, 2010, doi:10.1016/j.jfca.2009.12.002**

Andréia Zilio Dinon, Diana Treml, Carla Souza de Mello, Ana Carolina
Maisonave Arisi
*Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências
Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar
Gonzaga, 1346, 88034-001
Florianópolis, SC, Brasil.*

Resumo:

A soja Roundup ReadyTM (RR) é o primeiro organismo geneticamente modificado (OGM) aprovado para comercialização no Brasil. A rotulagem de produtos alimentícios no Brasil é obrigatória se o conteúdo de OGM exceder 1% (10 g.kg⁻¹). O DNA de 59 amostras de alimentos foi extraído com o objetivo de monitorar e quantificar a presença de soja RR em produtos à base de soja e em derivados de carne disponíveis no mercado brasileiro. Estas amostras foram analisadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para amplificar o gene da lectina da soja, e por *nested* PCR, para amplificar o DNA recombinante presente na soja RR. As amostras positivas para presença de OGM foram quantificadas usando PCR em tempo real. Os resultados mostraram que no total das 59 amostras analisadas, 54 foram positivas para o gene da lectina e seis foram positivas para soja RR, cinco destas apresentaram OGM abaixo de 10 g.kg⁻¹ e uma amostra apresentou OGM acima de 10 g.kg⁻¹.

Palavras-chave: análise de alimentos, OGM, DNA, soja, carne, PCR, PCR em tempo real.

3.1 Introdução

A força-tarefa intergovernamental do *Codex Alimentarius* específica para alimentos derivados de biotecnologia tem trabalhado para o estabelecimento de normas internacionais para tributações e recomendações de padrões para a rotulagem de ingredientes GM (BURLINGAME; PINEIRO, 2007). Métodos analíticos para a detecção de OGMs em alimentos têm sido amplamente desenvolvidos e utilizados para atender a legislação em diferentes países, a qual estabelece que produtos contendo ingredientes GMs autorizados em nível acima do limite legal devem ser rotulados (HOLST-JENSEN, 2008).

A primeira planta geneticamente modificada (GM) aprovada para comercialização no Brasil foi a soja RR (Roundup Ready, GTS 40-3-2, conforme www.ctnbio.gov.br). A legislação brasileira exige a rotulagem de alimentos que contenham um limite de 10 g.kg^{-1} , ou seja, 1% de OGM (BRASIL, 2003). Isso resulta na necessidade de monitorar o conteúdo de OGM em alimentos comercializados no país. Já existem algumas publicações científicas sobre a distribuição de material derivado de OGM em alimentos vendidos no Brasil (CARDARELLI et al., 2005; GREINER et al., 2005; BROD et al., 2007; BROD; ARISI, 2007; BROD; ARISI, 2008; GREINER; KONIETZNY, 2008; DINON, MELO, ARISI, 2008). Em trabalhos anteriores, a presença de soja RR foi detectada em produtos derivados de soja (BROD et al., 2007; 2008), em aditivos cárneos e produtos cárneos processados (BROD; ARISI, 2007).

Produtos derivados de soja são mundialmente utilizados em alimentos. A adição de proteínas de soja em produtos cárneos processados (salsichas, mortadelas, presuntos cozidos, entre outros) aumentou significativamente nos últimos anos devido ao crescente interesse em suas propriedades funcionais e nutricionais (BELLOQUE et al., 2002).

O objetivo proposto neste trabalho foi monitorar o conteúdo de OGM em derivados cárneos e produtos à base de soja disponíveis comercialmente no mercado brasileiro entre 2007 e 2008 a fim de avaliar a rotulagem destes produtos de acordo com a legislação vigente no Brasil. O ensaio de *nested* PCR foi usado para detectar a presença de soja RR e PCR em tempo real para quantificação do conteúdo de OGM nas amostras positivas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Amostras e material de referência

Um total de 59 amostras (47 derivados cárneos e 12 produtos à base de soja) foi adquirido entre 2007 e 2008 em supermercados locais de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Todas as amostras de derivados de soja foram fabricadas em dois estados diferentes da região sul do Brasil. Os derivados cárneos foram produzidos em três estados da região sul, dois do sudoeste e dois da região centro-oeste do Brasil. Um total de 19 diferentes marcas brasileiras foram analisadas (8 de produtos à base de soja e 11 de derivados cárneos). Nenhuma amostra apresentava identificação de ingrediente GM no rótulo. Os materiais de referência certificados (CRM) usados como controle positivo foram produzidos pelo instituto de Materiais de Referência Europeu (BF410, ERM). Eles consistiam de grãos de soja secos e pulverizados contendo 0, 1, 5, 10, 20 e 50 g.kg⁻¹ de soja Roundup ReadyTM (Fluka, Sigma-Aldrich). Soja não-GM foi gentilmente cedida por agricultores brasileiros.

3.2.2 Isolamento do DNA

O protocolo de extração de DNA baseou-se em Lipp et al. (1999) e foi descrito por Brod et al. (2007). Três extrações independentes foram realizadas com cada amostra e também com o CRM. As concentrações de DNA foram determinadas através da leitura da absorbância das amostras em 260 e 280 nm com espectrofotômetro (Hitachi U 2010, Tóquio, Japão).

3.2.3 Condições da PCR qualitativa

O par de iniciadores LEC1/LEC2 foi usado para amplificar um fragmento de 164 pares de base (pb) do gene da lectina, específico para detecção de soja (VOLLENHOFER et al., 1999). Os iniciadores GMO5/GMO9 e GMO7/GMO8 (MEYER; JACCAUD, 1997) foram usados para detecção de soja RR por *nested* PCR pela amplificação de um primeiro fragmento de 447 pb e um segundo fragmento, da *nested* PCR, de 169 pb, respectivamente. Esses iniciadores e as condições da PCR já foram descritas em nossos trabalhos anteriores (BROD et al., 2007; FERRARI et al., 2007).

3.2.4 Condições da PCR Quantitativa

O kit de detecção *TaqMan GMO 35S Soy Detection Kit* (Applied Biosystems) foi usado no equipamento de PCR em tempo real (ABI PRISM™ 7500 Detection System) de acordo com orientações do fabricante (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em placas de 96 poços em um volume final de 25 μL , contendo os reagentes do kit e 50 ng de DNA molde por reação. Em cada placa, padrões CRM (1, 5, 10, 20 e 50 g.kg^{-1} de soja RR) bem como cada uma das amostras foram analisados em triplicata. Controles negativos (controle negativo do kit, DNA soja não-GM e o NTC (*non-template control*)) e um controle positivo do kit (soja RR) foram analisados em duplicata. Os valores ΔCt obtidos para as amostras foram comparados com a curva de calibração obtida para os padrões CRM, permitindo calcular o conteúdo de OGM para cada amostra (BROD; ARISI, 2008).

3.3 Resultados e Discussão

A presença de DNA de soja e sua capacidade de amplificação foram confirmadas usando o par de iniciadores LEC1/LEC2, específico para o gene da lectina da soja. No total das 59 amostras de alimentos (47 derivados cárneos e 12 produtos à base de soja) analisadas, 54 apresentaram sinal positivo, um fragmento de 164 pb, para o gene da lectina da soja (Tabela 3.1), demonstrando que DNA com integridade suficiente para análise por PCR pode ser isolado usando o protocolo CTAB. Em 5 amostras (1 salsicha, 2 mortadelas de frango, 1 presunto cozido e 1 mortadela) não foi possível amplificar o gene da lectina. Os problemas encontrados para extração do DNA das matrizes alimentares podem ser relacionados à agregação do DNA de diversos ingredientes alimentares, o que interfere na liberação do ácido nucléico (KONIETZNY; GREINER, 1997). No entanto, vários estudos comprovam que o protocolo CTAB é útil para o isolamento do DNA de produtos alimentícios processados (GRYSON et al., 2004; OLEXOVÁ; DOVICOVICOVÁ; KUČHTA, 2004; MORIUCHI et al., 2007; MAFRA et al., 2008).

Todas as 54 amostras com sinal positivo para detecção do gene da lectina foram analisadas para detecção específica de soja RR com os iniciadores GMO5/GMO9. Para confirmar a amplificação específica do fragmento de soja RR, uma *nested PCR* foi realizada com os iniciadores GMO7/GMO8. Seis amostras (2 empanados de frango, 1 mortadela, 1 extrato de soja em pó e 2 proteínas texturizadas de soja) apresentaram

sinal positivo para detecção de soja RR, visualizado pela amplificação do fragmento de 169 pb, confirmando a presença de soja GM (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Detecção de soja Roundup Ready™ (RR) por *nested* PCR em amostras brasileiras de produtos cárneos e derivados de soja.

Amostras	Número de amostras	Amostras positivas para o gene da lectina	Amostras positivas para a soja RR
Salsicha	10	9	nd
Mortadela de frango	9	7	nd
Empanado de frango	13	13	2
Presunto	3	2	nd
Mortadela	12	11	1
Extrato de soja	3	3	1
Farinha de soja	4	4	nd
Proteína texturizada de soja	5	5	2
Total	59	54	6

*nd: significa não detectado, limite de detecção 0,01 g.kg⁻¹.

As seis amostras que apresentaram sinal positivo para detecção de soja RR por *nested* PCR foram analisadas por PCR em tempo real para determinar o conteúdo de soja RR. A fim de calcular a eficiência da PCR, curvas de calibração (Ct médio x log conteúdo DNA) para detecção da lectina e do P35S foram construídas a partir do CRM contendo 10 g.kg⁻¹ de soja RR usando quantidades decrescentes de 250, 125, 50 e 10 ng de DNA-molde por reação. Os valores de inclinação da curva foram de -3.45 para ambas as curvas (lectina e P35S) e a eficiência da amplificação foi estimada em 95%. As curvas-padrão

foram aceitas quando a inclinação indicava 100% de eficiência da PCR dentro da tolerância aceitável ($\pm 10\%$), variando de -3.1 a -3.6 (QUIRASCO et al., 2008).

Os valores de ΔCt foram calculados para os CRMs usando três extrações independentes de DNA para cada CRM e os valores médios foram plotados no gráfico contra o logaritmo do conteúdo de OGM usando 50 ng de DNA por reação (Figura 3.1). O conteúdo desconhecido de OGM das amostras foi então quantificado usando a equação do gráfico.

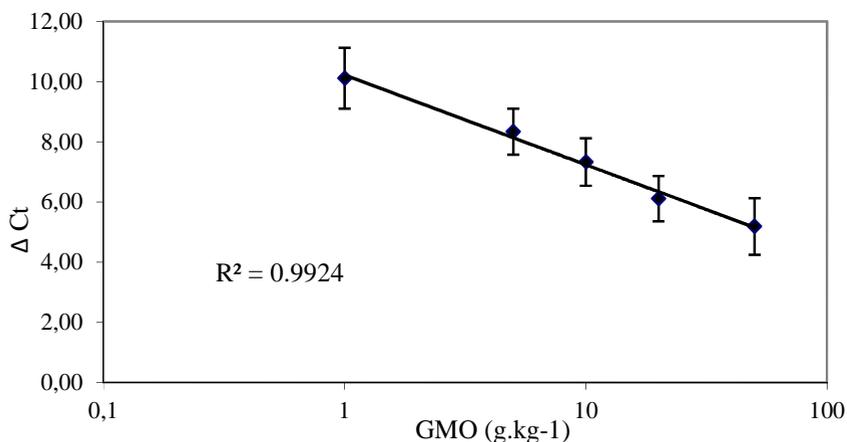


Figura 3.1 – Curva de calibração ΔCt do P35S versus o logaritmo do Material de Referência Certificado contendo 1, 5, 10, 20 e 50 g.kg⁻¹ de soja Roundup ReadyTM usando *TaqMan GMO 35S Soy Detection Kit* (Applied Biosystems, CA, EUA) e 50 ng de DNA/reação.

O conteúdo de OGM dos seis produtos variou de 0,1 a 16,3 g.kg⁻¹ (Tabela 3.2). Somente um produto (empanado de frango) continha mais do que o limite de 10 g.kg⁻¹ de OGM e, portanto, deveria apresentar esta informação no rótulo (BRASIL, 2003). Com exceção desta amostra, todas as outras apresentaram OGM abaixo de 10 g.kg⁻¹. Para estas amostras, a rotulagem não é necessária segundo a legislação brasileira.

Tabela 3.2 - Conteúdo de OGM para amostras brasileiras de produtos cárneos e derivados de soja estimada por PCR em tempo real usando TaqMan GMO 35S Soy Detection Kit.

Amostras	GMO (g.kg⁻¹)*
Empanado de frango (1)	2,7 ± 1,5
Empanado de frango (2)	16,3 ± 1,8
Mortadela	1,0 ± 0,2
Extrato de soja	0,2 ± 0,1
Proteína texturizada de soja (1)	0,1 ± 0,1
Proteína texturizada de soja (2)	1,7 ± 1,5

*Valores são a média ± desvio-padrão de 3 extrações independentes de DNA para cada amostra.

Entretanto, existem diferentes eventos de soja GM que foram aprovados em outros países, como o evento A2704-12 (Aventis Cropscience) e o evento MON89788 (Monsanto Company) (http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm), RR soybean Event GTS 40-3-2 é o único evento de soja GM aprovado pela legislação brasileira. Ele tem sido cultivado no Brasil desde 2003. Neste trabalho, apenas este evento-específico foi detectado por *nested* PCR; outros eventos não foram detectados por estes iniciadores específicos. Ujhelyi e co-autores (2008) monitoraram a presença de soja GM em produtos alimentícios disponíveis no mercado húngaro e 38% das amostras analisadas indicaram a presença de soja GM em alimentos contendo soja, e 6% destas continham teor de soja RR acima do limite de 9 g.kg⁻¹, sendo este o limite para rotulagem obrigatória na União Européia. Taski-Ajdukovic e colaboradores (2009) analisaram 50 produtos derivados de carne disponíveis no mercado da Sérvia, dos quais 20 foram positivos para presença do promotor CaMV 35S e todas as amostras continham teor de OGM abaixo de 1 g.kg⁻¹.

Em um trabalho anterior, foram analisados 62 produtos à base de soja adquiridos no Brasil em 2005: 40 amostras (64%) foram positivas para detecção de soja RR e 2 amostras (3%) continham OGM acima de 10 g.kg⁻¹ (BROD; ARISI, 2008). Produtos brasileiros derivados de carne foram analisados em 2005: três de um total de oito amostras (37%) continham soja RR (BROD; ARISI, 2007). Greiner e Konietzny (2008) analisaram 100 amostras de alimentos comercializados no Brasil em 2005: 78 amostras foram positivas para soja RR, 36 contendo OGM acima de 10 g.kg⁻¹. No entanto, os

resultados aqui apresentados em 2007 e 2008 mostraram que 11% das amostras continham soja RR e apenas uma amostra do total de 54 (2%) apresentou conteúdo de soja RR acima de 10 g.kg⁻¹.

3.4 Conclusão

Nossos resultados confirmaram a presença de soja RR em 6 amostras, de um total de 54 amostras de derivados de carne e produtos à base de soja comercializados no Brasil de 2007 a 2008. Destas, apenas uma deve ser rotulada de acordo com a legislação brasileira.

Agradecimentos

Esse trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e CT-INFRA, Fundo de Infra-Estrutura para Ciência e Tecnologia, Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Ministério de Ciência e Tecnologia, Brasil. Andréia Zilio Dinon e Carla Souza de Mello são bolsistas CNPq e CAPES, respectivamente e Diana Treml é bolsista CNPq, PIBIC-UFSC, Brasil. Agradecemos Maria Regina Branquinho e Paola Cardarelli pela colaboração na discussão deste trabalho.

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DOS GENES *cryIA.105* E *cry2Ab2* EM ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Artigo publicado em doutorado-sanduiche pelo projeto de cooperação internacional CAPES-Wageningen

DINON, A.Z., PRINS, T.W., DIJK, J.P., ARISI, A.C.M., SCHOLTENS, I.M.J., KOK, E.J. Development and validation of real-time PCR screening methods for detection of *cryIA.105* and *cry2Ab2* genes in genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 400, n. 5, p. 1433-1442, 2011.

4. Desenvolvimento e validação de método de identificação por PCR em tempo real para detecção dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* em organismos geneticamente modificados

Projeto de cooperação internacional CAPES-Wageningen

Artigo publicado - *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 400, n. 5, p. 1433-1442, 2011, doi: 10.1007/s00216-011-4875-9

Andréia Z. Dinon¹, Theo W. Prins², Jeroen P. van Dijk², Ana Carolina M. Arisi¹, Ingrid M. J. Scholtens², Esther J. Kok²

¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 880034-001, Florianópolis, SC, Brazil. ²RIKILT—Institut of Food Safety, Wageningen University and Research centre, P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands.

Resumo

Iniciadores e sondas foram desenvolvidos para detecção elemento-específica dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, baseado na sequência de DNA presente no milho GM MON89034. Genes *cry* estão presentes em muitas plantas GM e são alvos importantes para o desenvolvimento de métodos de detecção elemento-específico para OGMs. Métodos elemento-específico podem ser úteis na triagem de OGMs na cadeia de produção de alimentos e rações. Além disso, uma combinação de elementos GM pode indicar a potencial presença de OGMs não autorizados (UGMs). Combinações de iniciadores e sondas foram avaliadas em termos de especificidade, eficiência e limite de detecção. Exceto para especificidade, o experimento completo foi realizado com nove corridas de PCR, em nove dias diferentes e pelo teste de oito concentrações de DNA. Os resultados mostraram alta especificidade e eficiência para detecção dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*. O limite de detecção foi entre 0,05 e 0,01 ng DNA por PCR para ambos os ensaios. Estes dados confirmam a aplicabilidade destas novas combinações de iniciadores e sondas para detecção de elementos que podem contribuir para a triagem de grãos GM e UGMs em amostras de alimentos e rações.

Palavras-chave: GMO, UGM, PCR em tempo real, genes *cry*.

Abstract

Primers and probes were developed for the element-specific detection of *cry1A.105* and *cry2Ab2* genes, based on their DNA sequence as present in GM maize MON89034. *Cry* genes are present in many genetically modified (GM) plants and they are important targets for developing GMO element-specific detection methods. Element-specific methods can be of use to screen for the presence of GMOs in food and feed supply chains. Moreover, a combination of GMO elements may indicate the potential presence of unapproved GMOs (UGMs). Primer-probe combinations were evaluated in terms of specificity, efficiency and limit of detection. Except for specificity, the complete experiment was performed in 9 PCR runs, on 9 different days and by testing 8 DNA concentrations. The results showed a high specificity and efficiency for *cry1A.105* and *cry2Ab2* detection. The limit of detection was between 0.05 and 0.01 ng DNA per PCR for both assays. These data confirm the applicability of these new primer-probe combinations for element detection that can contribute to the screening for GM and UGM crops in food and feed samples.

Keywords: GMO, UGM, real-time PCR, *cry* genes.

4.1 Introduction

In the European Union (EU) regulations have been implemented containing harmonized provisions for the risk assessment and authorization of genetically modified organisms (GMOs) as well as for traceability, labelling and post-marketing surveillance of the use of GMOs in the food and feed chain (EUROPEAN COMMISSION, 2003). At present (January 2011) a total 31 genetically modified (GM) crop events in 6 different species are authorized in the EU including 17 for maize, 6 for cotton, 3 for oilseed rape, 3 for soya beans, 1 for potato and 1 for sugar beet (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Appropriate methods for detection and quantification of GMOs are required to control the compliance with legal provisions (MARMIROLI et al., 2008). The European Union Reference Laboratory (EURL) provides official methods for the event-specific detection and quantification of material from all authorized GMOs (EURL, 2010) and event-specific or construct-specific methods for a number unauthorised GMs (UGMs). UGMs can be GMOs that are approved in other countries but not within the EU or that have not been approved elsewhere in the world (HOLST-

JENSEN et al., 2009). The EU threshold for UGMs is zero, which means that their presence is not allowed in food or feed materials (DAVISON, 2010).

The detection and identification of specific elements like promoters, coding sequences and terminators present in GM events can be very helpful to identify UGMs (PRINS et al., 2008; RUTTINK et al., 2010). If the presence of specific elements cannot be accounted for by the detected events in a particular sample, this is indicative for the presence of an UGM. Querci et al. (2009) developed a real-time PCR based ready-to-use multi-target analytical system for simultaneous identification of 39 GM events by using event-specific, construct-specific and species-specific primers and probe combinations. This system allows identification of GM plants approved in EU and in the process of being approved. However, as this system only specifically identifies these GMO events, it is not suitable for the detection of UGMs. For this the so-called GMO matrix approach is required. This approach allows to describe and to identify each GMO by the presence of the respective target sequences in comparison with the screening results obtained for the analyzed sample. This matrix basically consists of a table in which the rows represent the content of genetic elements of the respective GMO, while the columns define the targeted sequence elements analyzed in the matrix (QUERCI et al., 2009). Up to date GMO databases and a network of collaborating laboratories are required for the addition of further targets which are frequently present in GM plants (WAIBLINGER et al., 2010; QUERCI et al., 2010). With respect to this development for new approaches for GMO detection, including UGMs, it is important to continuously expand and validate detection methods for GM events and elements, including promoters, coding sequences and terminators.

Cry genes are the most commonly applied genes present in GM events to achieve insect resistance. There are more than 200 *cry* toxins listed by the Bt delta-endotoxin nomenclature committee (CRICKMORE et al., 1998). Their origin is from the soil bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), derived GM elements may result from codon optimization or even domain swapping. *Cry* toxins expressed in GM plants show insecticidal activity against one or more insect pests. They have a defined spectrum of activity generally restricted to a few species of insects or their larvae. For this reason, it is common to find more than one *cry* gene in the same GM plant to render the crops resistant to a broader range of insects. These toxins are classified according to their amino acid sequence homology. There are three domains and five

conserved sequence blocks common to a large majority of these proteins (CRICKMORE et al., 1998; DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001). Different cry proteins can show 19-90% of identity among them (HOFTE; WHITELEY, 1989). PCR amplification using gene-specific primers has been performed for the detection of known and novel cry genes (ACHARJEE et al., 2010; SINGH et al., 2008; PORCAR; JUAREZ-PEREZ, 2003; BERÓN et al, 2005; DAVOLOS et al., 2009; TAN et al., 2009).

CryIA.105 and *cry2Ab2* are present in maize MON89034 (MON-89Ø34-3) and confer resistance to Lepidopteran pests. They provide control of *Ostrinia* species (e.g. European corn borer, Asian corn borer), and *Diatraea* species (e.g. South-western corn borer, sugarcane borer). GM maize MON89034 also provides a high level control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and improves protection from damage caused by corn earworm (*Helicoverpa zea*) (ANDERSON et al., 2008). *CryIA.105* and *cry2Ab2* are also present in other related stacked GM maize varieties that include MON89034: MON89034 x MON88017, MON89034 x NK603 (TAYLOR et al., 2007a,b) and MON89034 x TC1507 x MON88017 x DAS-59122-7 (UNITED STATES, 2009).

The *cryIA.105* gene codes for a protein consisting of 3 domains that are identical with other cry proteins used in GM plants. Cry1A.105 shows 93.6%, 90%, and 76.7% of amino acid sequence homology respectively with the cry1Ac, cry1Ab and cry1F proteins from *B. thuringiensis*. The amino acid sequences of domains I and II are identical with the respective domains from cry1Ab and cry1Ac proteins. Domain III is almost identical to cry1F, while the C-terminal domain is identical to cry1Ac (CANADIAN FOOD AUTHORITY, 2009).

The Cry2Ab protein present in MON89034 is also present in GM cotton MON15985 and 3 stacked varieties of this cotton: LLcotton25 x MON15985, MON15985 x MON1445, MON15985 x MON88913 (CORBISIER et al., 2010).

Molecular characterization of GM maize MON89034 demonstrated that the DNA inserted into the genome is present at a single locus and contains one functional copy of the *cryIA.105* and the *cry2Ab2* expression cassettes (ANDERSON et al., 2008). Current detection of these genes is based on validated methods for event-specific detection of GM maize MON89034 and GM cotton MON15985 (JRC, 2008 a,b,c). It is important to also develop primers for element-specific detection of these cry targets. This will enable the use of these elements in a matrix-based approach for the detection of UGMs, as their presence,

in the absence of the MON89034 and MON15985 events, may identify GM varieties that are not yet approved for the European market. The specificity and sensitivity of the methods need to be tested by the use of reference materials (WAIBLINGER et al., 2010).

On this basis, the present study shows the design of real-time PCR assays for specific detection of the *cryIA.105* and *cry2Ab2* genes, based on their DNA sequence present in GM maize MON89034. These assays were evaluated by real-time PCR in terms of specificity, limit of detection and efficiency.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Sample material and DNA isolation

Certified Reference Materials (CRMs), certified as being non-GM maize containing less than 2.0 g/kg of MON810, MON863, NK603, MON88017 and MON89034, and samples certified to contain a percentage of a defined GM maize containing a *cry*-related sequence, were selected in order to determine the specificity of *cryIA.105* and *cry2Ab2* primers: ERM-BF412f (SYN-BTØ11-1 or Bt11, 4.89%), ERM-BF411f (SYN-EV176-9 or Bt176, 5%), ERM-BF413f (MON-ØØ81Ø-6 or MON810, 5%), ERM-BF418d (DAS-Ø15Ø7-1 or TC1507, 9.86%), ERM-BF416d (MON-ØØ863-5 or MON863, 9.85%), ERM-BF424d (DAS-59122-7 or DAS59122, 9.87%), ERM-BF423d (SYN-IR6Ø4-5 or MIR604, 9.85%), ERM-BF422d (DAS-21Ø23-5 x DAS-24236-5 or 281-24-236 x 3006-210-23, 10%) (European Reference Materials, ERM, Geel, Belgium) and AOCS 0906-E (MON-89Ø34-3 or MON89034, >99.42%), AOCS 0406-D (MON88Ø17-3 or MON88017 >99.05%), AOCS 0406-A (non-transgenic maize, <0.2%), AOCS 0804-C (MON-ØØ531-6 or MON531 >97.39%), AOCS 0804-D (MON-15985-7 or MON15985 >98.45%) (American Oil Chemists' Society, AOCS; Illinois, USA). The DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) was used for DNA isolation according to the manufacture's protocol, only modified by including a lysis treatment with CTAB buffer (20 g/L CTAB; 1.4 M NaCl; 0.1% Tris; 20 mM Na₂EDTA, pH 8.0) instead of AP1 buffer supplied in the kit. Also 20 µL of proteinase K (20 mg/mL) was added to each sample during the incubation at 60° C for 15 min. DNA concentrations were determined on a Thermo Scientific NanoDrop™ spectrophotometer with measurements at UV region from 220 to 350 nm.

4.2.2 Primer design

Primers and probes were designed based on the sequences of the *cry1A.105* and *cry2Ab2* genes that are present in MON89034, GenBank accession: FB707509 and AR260587.1, respectively. Sequence analysis was performed at the GenBank database by using the Blastn tool (Basic Local Alignment Search Tools Nucleotide) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The alignments among similar sequences were performed by using the software ClustalW (LARKIN et al., 2007) with other sequences and *cry* genes that are present in GM events. Beacon Designer 7.0 was used to obtain the primers and probes (Premier Biosoft, California, USA). The software settings were adjusted for the following parameters as follows: melting temperature (T_m) of $59 \pm 1^\circ \text{C}$, length from 18 to 30 bp and amplicon from 75 to 150 bp. The probes were designed with 18 to 30 bp, T_m $10 \pm 2^\circ \text{C}$ higher than primer T_m and they were labelled with 6-carboxyfluorescein (FAM) and TAMRA-quenched oligonucleotide. Primers and probes are described in Table 4.1. The endogenous *hmg* (high mobility group) maize gene was amplified by primers ZM1-F, ZM1-R and probe ZM to confirm the quality of the isolated DNA (JRC, 2008a). The performance of the *hmg* PCR using DNA isolated with the DNA isolation method described in this article has been in-house validated as the endogenous reference gene of several event-specific methods (SCHOLTENS et al., 2010).

Table 4.1 - Primers and probes for *cry* genes and *hmg* gene detection. F = forward primer, R = reverse primer, P = probe.

Primer	Sequence (orientation 5' - 3')	Amplicon size	Reference
cry1A.105 - F	TCAGAGGTCCAGGGTTTACAGG	133 bp	this work
cry1A.105 - R	GTAGTAGAGGCATAGCGGATTCTTG		
cry1A.105 - P	AGACATTCTTCGTCGCACAAGTGGAGGACC		
cry2Ab2 - F	AATTCTAACTACTTCCCCGACTACTTC	121 bp	this work
cry2Ab2 - R	ACGGAGAGGCGATGTTCCCTG		
cry2Ab2 - P	TCTCTGGTGTTCCTCTCGTCGTCGCA		
ZM1 – F (hmg)	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	79 bp	[27]
ZM1 – R (hmg)	GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT		
probe ZM (hmg)	CAATCCACACAAACGCACGCGTA		

4.2.3 Real-time PCR

PCR amplification was performed in a 96-well microtiter plate in a total volume of 25 μL containing 12.5 μL Diagenode Mastermix 2x (real-time PCR Mastermix, Diagenode, Liege, Belgium), 300 nM of each primer, 150 nM probe, 5.6 μL milliQ water and 5.0 μL of DNA. Samples were amplified on iQ5 and MyiQTM (Bio-Rad Laboratories, California, USA) according to the following protocol: 2 min at 50° C, 10 min at 95° C, 45 cycles of: 15 s at 95° C and 1 min at 60° C. All samples were analyzed in duplicate. The real-time PCR conditions were the same for all PCR reactions.

The specificity of *cry1A.105* and *cry2Ab2* primers/probe was verified by testing all CRMs listed in Table 6. The duplicate test was performed by using a final concentration of 50 ng DNA per PCR reaction.

The real-time PCR analysis was evaluated for each primer/probe pair by the serial dilution of CRM MON89034 100% (AOCS 0906-E) with water to final concentrations of 150, 30, 6, 1.20, 0.60, 0.25, 0.05 and 0.01 ng DNA per PCR reaction. The copy numbers in the calibration curve samples are obtained by dividing the amount of sample DNA (picograms) by the published average 1C value for the *Zea mays* genome corresponding to 2.725 pg (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991; JRC, 2008b). Therefore, the estimated copy numbers in the calibration curves were calculated to be 55,046; 11,009; 2,202; 440; 220; 88; 18 and 4 copies of haploid genome, respectively. Concentrations from 0.01 to 150 ng DNA per PCR were tested in 9 different PCR runs in duplicate in a total period of 39 days of experiment. The lowest concentrations, 0.01 and 0.05 ng DNA per PCR, were tested an additional 6 times in 8 of the PCR runs. Outliers were identified and excluded of the analysis based on quartile distribution of Ct-values (BURNS et al., 2005). All real-time PCR runs were evaluated separately by using the automatic settings for each run. Two observations for the 0.05 ng DNA per PCR were used for the evaluation of the efficiency and the correlation coefficient (R^2).

The 95% confidence interval (CI) was calculated based on the difference between the upper and lower 95% confidence limits with the standard formula: upper/lower 95% confidence limit = sample mean \pm 1.96 (standard error of the sample mean).

4.3 Results

4.3.1 DNA quality

The DNA isolated from 100 mg of GM maize MON89034 (AOCS0906 - E) and non-GM maize (AOCS 0406 - A) showed a final concentration range of 30 ng/ μ L to 54 ng/ μ L and an absorbance ratio A₂₆₀/A₂₈₀ nm of 1.83 to 1.92. The DNA quality of all CRMs from Table 6 was also checked by spectrophotometer and PCR. Expected amplification products for GM maize MON89034 were obtained by using 8 different DNA concentrations from 0.01 to 150 ng DNA per PCR reaction with *hmg* primers and probe. Amplification of *hmg* was observed for all maize samples as expected. The Ct-values for *hmg* detection ranged from 22.82 to 37.25 for the DNA concentration range tested.

4.3.2 Primer and probe design

Primers and probes were designed based on the sequences of the *cryIA.105* and *cry2Ab2* genes present in GM maize MON89034 (<http://gmdd.shgmo.org/index/search>). Blastn search and ClustalW alignment showed that several regions of the *cryIA.105* sequence between positions 5542 and 5748 are completely identical with GM events that contain the *cryIAc* gene, for instance: brinjal (GenBank DM460255.1); soybean (GenBank HB386795.1) and cotton (GenBank EA731070.1). Therefore, the most dissimilar region with other GM sequences was selected for primer design in order to avoid cross-reactivity with non-target sequences. The resulting amplicons of 133 bp for *cryIA.105* and 121 bp for *cry2Ab2* were also analysed by Blastn analysis against the patent sequence databases and nucleotide sequence collection at the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). For the patent database, both the *cryIA.105* and *cry2Ab2* amplicons returned 100 blast hits from a total of 26 and 16 different patents, respectively. All hits found showed high sequence coverage between 93% and 100%. For the nucleotide sequence collection, *cryIA.105* and *cry2Ab2* amplicons were also submitted to a Blastn analysis. For the hits returned after the *cryIA.105* amplicon query, 18 hits showed a high coverage of at least 96%, all from different *cry* genes of *B. thuringiensis*. Those with at least 70% sequence identity were aligned with the *cryIA.105* sequence. For the *cry2Ab2* amplicon, 3 of 20 blast hits were

correspondent to *cry* genes and only 1 showed coverage of more than 90% and was aligned with the *cry2Ab2* sequence. The remaining sequences showed coverage of 41% or less and were not analysed further. Both amplicons were aligned using ClustalW with sequences that showed sequence coverage between 90% and 98% and with an identity of at least 70%. *Cry* genes present in GM events were also included in the alignment. Table 4.2 shows the identity of *cryIA.105* and *cry2Ab2* primers and probe sequences with the selected sequences.

Table 4.2 - Comparison of primers and probe sequences with related *cry* sequences from *B. thuringiensis* and GM events. Only nucleotides that differed from *cryIA.105* (A) or *cry2Ab2* (B) are indicated. Identity was calculated based only on the primers and probe sequences. F = forward primer, R = reverse primer, P = probe.

A *cryIA.105* primers and probe

<i>cry</i> seq	Source	Genbank nr	Identity	<i>cryIA.105</i> - F (5'-3')	<i>cryIA.105</i> - P (5'-3')	<i>cryIA.105</i> - R (5'-3')
<i>cryIA.105</i>	Maize MON89034	FR707509		TCAGAGGTCAGGGTTACAGG	AGACATTCTTCGTCCACAAAGTGGAGGACC	CAAGATCCCGCTATGCCCTCTACTAC
<i>cryIF</i>	<i>B. thuringiensis</i>	M63897.1	96%	.A.....G..C.....G...	...T.....A..A.....A.....
<i>cryIK</i>	<i>B. thuringiensis</i>	U28801.1	86%	.A.A...G.....	G..T..C..C.....A.....	.T.....T..T.....
<i>cryI</i> #V4	<i>B. thuringiensis</i>	L32019.1	75%	.T.....A.....	T..T..C.....AA..A..G.A.ACT..CA.	T.....T.....T.....G..
<i>cry8Da</i>	<i>B. thuringiensis</i>	FN196432.1	74%	.T.A....T..A.....	...T.CC...TAG.AA..G.T.TA.C...A..T.....T.....
<i>cryIAC</i>	<i>B. thuringiensis</i>	EU447666.1	78%	.T.A...A....A.....	.AG..A...TA..AA.TTAC.C..A.T.	T.....T.....C..T.....
<i>cryIF</i>	Cotton TC1507	DD459037.1	87%	.A.....G..G.....C..G..A.....T.....	.C..G..A.....
<i>cryIF</i>	Cotton 281-24-34	CG199873.1	57%	C.G...T...T.AA.G.G.G..	T.....C...CAT..T.CAA...A.TG	..AG.....T.CAC.TG..A..CGT
<i>cryIA(h)</i>	GM event	141424	61%	.TCA..A...AAC...G...	...A..C.T..GAT.T.ACA...TA	TCC.G.....C...AGC..C..
<i>cryIAC</i>	Cotton Event 737	AR656168.1	68%	..T.G....T..AT.C..G..A	..G..GAC..A...TA.G..A.GT...	..T...TCT.AT...T...C.TC.A
<i>cryIAC</i>	GM event	CG195874.1	57%	AT.C..A...AAA..A.T.AA	T.....C...CAT..T.CAA...A.TG	A..A.....A...ATAG..G..G.
<i>cryIAC</i>	Cotton MON15985	EAL35632.1	49%	..GA..A.GCCA.CU..CACAC	...TT.CT.C.TGGA.G..GT.....A..T	.T...TCT.AT...T...C.TC.A

B *cry2Ab2* primers and probe

<i>cry</i> seq	Source	Genbank nr	Identity	<i>cry2Ab2</i> - F (5'-3')	<i>cry2Ab2</i> - P (5'-3')	<i>cry2Ab2</i> - R (5'-3')
<i>cry2Ab2</i>	Maize MON89034	AR260587.1		AATTCCTAACTACTTCGGACTACTTC	TCTCTGGTGTCTCTCTCGTCCGCSCA	CAGGAACATCGGCTCTCGGT
<i>cry2Aa</i>	Synthetic construct	EUI09565.1	81%	..C..C.....G.....	...C..C..G..G.....GA..A.G.AG..C....

4.3.3 Specificity

Thirteen CRMs were tested with both the *cryIA.105* and the *cry2Ab2* method. A *cryIA.105* element was present in 1 of these and a *cry2Ab2* element in 2. The positive control maize MON89034 produced the expected amplification signal with Ct mean \pm SD equal to 24.64 ± 0.06 for *cryIA.105* and 24.98 ± 0.09 for *cry2Ab2* detection. GM cotton MON15985 generated the expected amplicon with *cry2Ab2* primers and probe and it showed a Ct mean \pm SD equal to 25.58 ± 0.10 . Neither of the two methods showed amplification for any of the non-target samples tested (Table 4.3).

Table 4.3 - List of Certified Reference Materials used to assess the specificity of the *cryIA.105* and *cry2Ab2* primers and the results obtained after duplicate testing.

Sample	Reference material	% GMO	Estimated copy number in 50 ng genomic DNA	<i>cry</i> element	<i>cryIA.105</i> detection	<i>cry2Ab2</i> detection
maize	MON89034	100%	18349	<i>cryIA.105</i> , <i>cry2Ab2</i>	+	+
	Bt11	4.89%	897	<i>cryIAb</i>	-	-
	Bt176	5%	917	<i>cryIAb</i>	-	-
	MON810	5%	917	<i>cryIAb</i>	-	-
	TC1507	9.86%	1809	<i>cryIF</i>	-	-
	MON863	9.85%	1807	<i>cry3Bb1</i>	-	-
	DAS59122	9.87%	1811	<i>cry34Ab1</i> , <i>cry35Ab1</i>	-	-
	MIR604	9.85%	1807	<i>cry3A</i>	-	-
	MON88017	>99.05%	>18174	<i>cry3Bb1</i>	-	-
	Non-transgenic maize*	<0.2%*	<37	none	-	-
	cotton	281-24-236x3006-210-23	10%	2146	<i>cryIAc</i> , <i>cryIF</i>	-
MON531		>97.39%	>20899	<i>cryIAc</i>	-	-
MON15985		>98.45%	>21127	<i>cry2Ab2</i>	-	+

*Non-transgenic maize AOCS 0406-A contained <0.2% of MON810, MON863, NK603, MON88017 and MON89034

(<http://www.aocs.org/files/TechnicalPDF/0406A.pdf>).

4.3.4 Limit of detection

To estimate the limit of detection (LOD), GM maize MON89034 was analyzed from a pool of 3 independent DNA isolations. Two different DNA concentrations, 0.01 and 0.05 ng DNA per PCR reaction were analysed in a total of 8 replicates coming on 8 different days of PCR analysis. At 0.01 ng DNA, *cryIA.105* and *cry2Ab2* elements were detected in respectively 77% and 69% of the samples tested. The amount of 0.05 ng showed 100% of detection for *cryIA.105* and 94% of detection for *cry2Ab2* (Table 4.4). Non GM maize was also tested in a total of 18 times in 9 PCR runs, showing a positive signal 5 times (28%, Ct mean 38.72) for *cryIA.105* detection and 4 times (22%, Ct mean 37.31) for *cry2Ab2* detection. No amplification was observed for the 4 extraction controls analyzed or the 16 water controls.

Table 4.4 - Limit of detection for *cryIA.105* and *cry2Ab2* in a total of 64 samples tested in 8 independent PCR runs for 2 different concentrations (0.05 and 0.01 ng DNA/PCR).

ng/PCR	Estimated copy number per PCR reaction	Ct mean	positive/ total	% positive
<i>cryIA.105</i>				
0.05	18	35.43	64/64	100
0.01	4	37.85	49/64	77
<i>cry2Ab2</i>				
0.05	18	35.36	60/64	94
0.01	4	36.96	44/64	69

4.3.5 Efficiency

The efficiency and linear response were evaluated for both PCR methods in 9 separate experiments. Visual inspection of the calibration lines showed a clear linear trend for all tests, when Ct values were plotted against the log value of the DNA amount. The only exception was the 150 ng sample for the *cryIA.105* PCR that was above the regression line in all cases. Figure 4.1 shows the amplification plots and standard curve of the 8th PCR run that showed results close to the average of all PCRs for each assay. For generation of the regression lines, the full range from 0.05 to 150 ng DNA per reaction was used as well as a smaller range, omitting the 150 ng samples. The main characteristics of the PCR regression lines are shown in Table 4.5. The concentration and the Ct-values obtained for each PCR run are shown in the electronic supplementary material (Table S1).

Table 4.5 - Parameters of PCR standard curve for *cryIA.105* and *cry2Ab2* detection based on 9 PCR runs with samples tested in duplicate for 150, 30, 6, 1.20, 0.60, 0.25 and 0.05 ng DNA per PCR reaction.

A *cryIA.105* from 150 to 0.05 ng DNA

PCR	Efficiency	Slope	R ²
1	101%	3.29	0.99
2	115%	3.01	0.99
3	114%	3.03	0.97
4	125%	2.84	0.98
5	129%	2.78	0.97
6	126%	2.83	0.95
7	128%	2.80	0.93
8	124%	2.86	0.97
9	116%	2.99	0.98
Mean	120%	2.94	0.97
95% CI	114-125%	2.83-3.04	0.96-0.98

B *cryIA.105* from 30 to 0.05 ng DNA

PCR	Efficiency	Slope	R ²
1	96%	3.43	0.99
2	102%	3.27	1.00
3	97%	3.39	0.98
4	105%	3.21	0.99
5	108%	3.15	0.99
6	98%	3.38	0.99
7	99%	3.34	0.99
8	102%	3.28	0.99
9	102%	3.28	1.00
Mean	101%	3.30	0.99
95% CI	98-103%	3.24-3.36	0.99

Table 4.5 - Continuation**C** *cry2Ab2* from 150 to 0.05 ng DNA

PCR	Efficiency	Slope	R ²
1	101%	3.30	1.00
2	100%	3.29	1.00
3	103%	3.26	0.99
4	106%	3.19	0.99
5	93%	3.51	0.98
6	100%	3.32	0.99
7	101%	3.30	1.00
8	100%	3.31	0.99
9	101%	3.29	0.99
Mean	101%	3.31	0.99
95% CI	98-103%	3.25-3.36	0.99

D *cry2Ab2* from 30 to 0.05 ng DNA

PCR	Efficiency	Slope	R ²
1	96%	3.42	1.00
2	102%	3.27	0.99
3	93%	3.49	1.00
4	103%	3.25	0.98
5	86%	3.73	0.97
6	101%	3.30	0.99
7	100%	3.31	1.00
8	98%	3.38	0.99
9	104%	3.23	0.99
Mean	98%	3.37	0.99
95% CI	94-102%	3.27-3.48	0.99

4.4 Discussion

4.4.1 Primer design and analysis of specificity

The *cryIA.105* amplicon showed a high identity with *cryIF*, *cryIAc* and *cryIAb* nucleotide sequences from *B. thuringiensis*. This was anticipated since the Cry1A.105 protein has high identity with Cry1F, Cry1Ac and Cry1Ab proteins (CRICKMORE et al., 1998; CANADIAN FOOD AUTHORITY, 2009). There are five conserved regions common to the majority of Cry proteins (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001). Moreover, several *cry* gene sequences are nearly identical representing slight variants of the same gene (HOFTE, WHITELEY, 1989; BERÓN; CURATTI; SALERNO; 2005). The *cry2Ab2* amplicon also showed a high identity of 80% with a *cry2Aa* synthetic gene (GenBank EU109585.1), which was applied in GM chickpea that is in development (ACHARJEE et al., 2010). Therefore, it is very important to perform a thorough analysis of homology in the development phase of the PCR. Also in the testing phase it is very important to include as many related *cry*-containing samples as possible to rule out unwanted cross-reactions. The primer/probe combination designed to detect the *cryIA.105* gene showed the expected result for amplification of this gene in GM maize MON89034. Both the *cryIA.105* and the *cry2Ab2* primers and probe successfully detected the target gene in GM maize MON89034. The *cry2Ab* gene in GM cotton MON15985 was also detected although the primers and probe were not specifically designed for this variety due to the undisclosed MON15985 sequence (CORBISIER et al., 2010). Given the results, it is very likely that the nucleotide sequence of the 121 bp *cry2Ab2* amplicon analyzed in this work share similarities between both GM events. Both primer and probe pairs also proved to be very specific since no cross-reactivity was observed with any of the non-target samples tested. We tested all twelve available certified reference materials containing one or more *cry* sequences. Although 100% material was not available, the estimated number of copies tested was at least 897, which should be enough for a substantial cross-reaction to show up during the PCR analysis. Of course, the emergence of new varieties means that specificity testing for GM elements will be an ongoing process. The performance of the *hmg* PCR using DNA isolated with the DNA isolation method described in this article was already in-

house validated as the endogenous reference gene of several event-specific methods (SCHOLTENS et al., 2010).

4.4.2 Limit of detection

The LOD, corresponding to the lowest amount in a sample that can be reliably detected, was experimentally determined to be between 0.01 and 0.05 ng DNA per PCR reaction. Theoretically, this corresponds to 4-18 copies of the haploid genome of GM maize MON89034. It is also equivalent to 0.02-0.10% of MON89034 in case of 50 ng DNA input per PCR reaction, or 0.01-0.05% of MON89034 in case of 100 ng DNA input. According to the ENGL Method Performance Requirements analytical methods should detect the presence of an analyte at $1/20^{\text{th}}$ of the threshold relevant for legislative requirements at least 95% of the time. The threshold for labelling GM products in EU is 0.9% of GMO which corresponds to an LOD value of less than 0.045% of GM in terms of ENGL criteria (ENGL, 2008). For 50 ng DNA input, the 0.045% is in between the upper and lower estimations for the LOD, so it cannot be guaranteed that 50 ng input DNA would be sufficient to meet the ENGL criteria for either method. For 100 ng input of DNA in a PCR reaction, this percentage is just below the estimated upper level of the LOD. It can be concluded that both methods meet the ENGL Method Performance Requirements for LOD when 100 ng maize DNA is used in the PCR reaction.

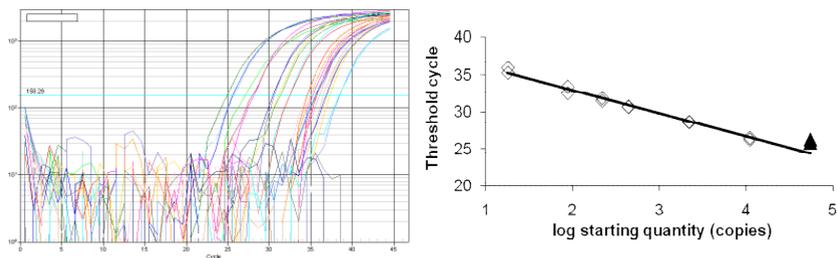
The non-GM maize AOCS 0406-A showed amplification for both methods in a limited number of reactions. Ct-values were similar to the Ct-values found for the lowest DNA concentration tested. However, the total percentage of positive reactions was approximately 3 times lower than that of the lowest DNA concentration. According to the analysis certificate of the non-GM maize AOCS 0406-A material used in this study, it contained less than 0.2% of MON810, MON863, NK603, MON88017 and MON89034. The certificate showed results for MON810, MON863, NK603 and MON88017 testing. MON810 was identified in 13 out of 15 samples while NK603 was identified in 1 out of 15 samples. The percentages were in the range of 0.05-0.2%, for presence of MON810 and NK603. MON863 and MON88017 were not detected in any of the 15 samples. The certificate showed no data on testing for MON89034 (CLAPPER; CANTRILL, 2009). Also other non-GM CRMs have sometimes been reported to contain low levels of GM material (CLAPPER; CANTRILL, 2007; CLAPPER; CANTRILL,

2009; TRAPMANN et al., 2002; TRAPMANN et al., 2005). In our experiments none of the 4 extraction controls and none of the 16 MQ controls showed any amplification for either PCR method. It is therefore unlikely that the unexpected positive results were due to a contamination in our laboratory. A more likely explanation would be the unintended low level presence in the CRM of 0% MON89034, or another *cryIA.105* and *cry2Ab* containing GM.

4.4.3 Efficiency and quantitative response

The *cry2Ab2* method performed in a linear quantitative manner in the full range tested, between 0.05 and 150 ng DNA per PCR reaction. In 9 experiments, the average slope of the trend line ranged from -3.19 to -3.51 corresponding to 106-93% of efficiency. The R^2 average value for *cry2Ab2* detection ranged from 0.98 to 1.00. According to Table 9C and Figure 6, results for *cry2Ab2* are in agreement with ENGL requirements that specify an efficiency range between 90 and 110% and an R^2 higher than or equal to 0.98, in order for a PCR method to be used for quantification (ENGL, 2008).

a



b

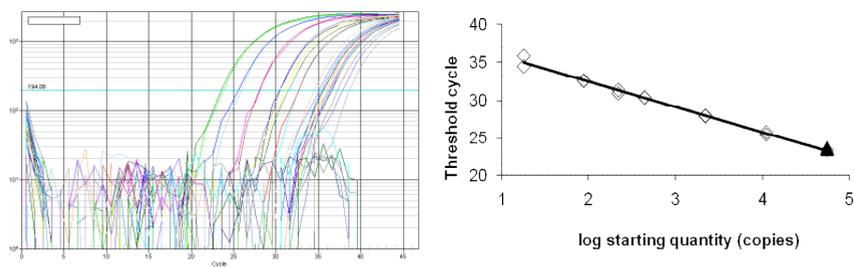


Figure 4.1 - Amplification plots and linear regression of 8th PCR run for GM maize MON89034. a. *cry1A.105* detection. b. *cry2Ab2* detection.

For the *cry1A.105* detection, 150 ng DNA input seemed not to fit a linear regression (Table 4.5 and Figure 4.1). In fact, for all repetitions, the 150 ng samples showed a higher Ct value than would be expected on the basis of a linear regression for the other samples. The average Ct-value for the amount of 150 ng DNA was 25.72 ± 0.73 and 25.96 ± 0.29 for 30 ng DNA, which can be expressed as a delta Ct of 0.24 ± 0.44 (available as electronic supplementary material, Table S1). In contrast, the expected delta Ct for a fivefold dilution is 2.32, assuming a PCR efficiency of 100%. Also, the R^2 overall average value for *cry1A.105* decreased from 0.99 to 0.97 when the 150 ng DNA was included. Finally, the overall efficiency dropped from a theoretically impossible 120% to a very acceptable 101% when 150 ng was excluded from the analysis. All these observations indicated that the *cry1A.105* PCR was sensitive to an inhibitory factor that may have been present in the DNA isolation that was used for these experiments. An option to

overcome this possible limitation would have been the design of new primers and probe. However, this might have compromised the specificity, given the high homology between the *cryIA.105* element and other *cry* elements. For *cry2Ab2* detection, inhibition at 150 ng DNA per PCR reaction was not observed and the R^2 and efficiency did not change when this concentration was omitted from the analysis. Data showed that the designed PCR methods performed in a linear quantitative manner between 0.05 and 30 ng DNA per PCR reaction for *cryIA.105* and between 0.05 and 150 ng DNA per PCR reaction for *cry2Ab2*.

4.5 Conclusions

New primers and probes specific for *cryIA.105* and *cry2Ab2* detection were developed. They showed a high specificity for target detection without cross-reactivity with other non-target GMOs tested. Also the limit of detection and quantitative response make both real time PCR methods adequate for the screening and detection of GMOs and GMO-derived products. These methods can be included in further interlaboratory studies to contribute to the development of strategies for GMO detection. To use these element-specific methods for quantification relative to the endogenous maize gene *hmg* it is necessary to perform an in-house validation including relative repeatability and reproducibility standard deviation and trueness. The parameters should comply with the ENGL Method Performance Requirements.

The detection of *cryIA.105* and *cry2Ab2* genes can be used to detect approved GMO- and UGM-derived products, which will aid the efforts to maintain GMO regulations within the European Union as well as worldwide.

Acknowledgments

AZD was supported by a doctoral fellowship from CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), Ministry of Education, Brazil, according the cooperation program CAPES-Wageningen (project 005/09).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

PCR qualitativa e PCR quantitativa em tempo real são importantes ferramentas para detecção e quantificação de OGMs em alimentos. Foi possível observar que as variedades de milho GM Bt11 e Bt176 não foram detectadas por PCR específica em 81 amostras de alimentos derivados de milho comercializados na região sul do Brasil de 2005 a 2007. A soja RR foi detectada em seis amostras, de um total de 54 amostras de derivados de carne e produtos à base de soja comercializados no Brasil de 2007 a 2008. Destas, apenas uma deveria ser rotulada de acordo com a legislação brasileira. Estes dados comprovaram que os alimentos analisados e comercializados na região sul do Brasil estavam de acordo com a legislação, exceto para uma amostra de produto a base de soja.

Iniciadores e sondas desenvolvidos para a detecção dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* por PCR em tempo real mostraram-se específicos e adequados para identificação de OGMs em alimentos. Estes iniciadores poderão ser incluídos em futuros estudos de validação interlaboratorial a fim de contribuir para o desenvolvimento de estratégias de detecção de OGMs em cumprimento com a legislação nacional e internacional. Devido ao aumento no número de diferentes eventos GM aprovados para o comércio mundial, é ainda necessário desenvolver e validar estratégias que permitam rapidez e eficiência na triagem e identificação de diferentes amostras quanto à presença e/ou ausência de OGMs como passo essencial para posterior quantificação.

Atualmente, a técnica de PCR em tempo real é uma poderosa ferramenta de quantificação de OGM, mas ainda é bastante influenciada por fatores como amostragem, eficiência da extração do DNA, presença de substâncias inibidoras da PCR presentes nos reativos da extração e na própria matriz do alimento, nível de degradação do DNA devido a processos de industrialização do alimento e da própria variação do genoma vegetal. Outro desafio inclui a quantificação de alimentos em matrizes complexas ou altamente processadas, tais como óleos, chocolates, embutidos cárneos, amidos, produtos submetidos a tratamentos térmicos como fritura e cozimento em microondas. Uma maneira de contornar estas limitações é pelo aperfeiçoamento das técnicas de extração de DNA atuais bem como pela detecção de OGMs na matéria-prima antes do processamento, como garantia de rastreabilidade e da correta rotulagem do produto final.

Também é necessário cuidado na escolha dos iniciadores para detecção elemento e evento-específico a fim de que estes realmente estejam validados de acordo com parâmetros internacionais e apresentem a especificidade adequada para a análise. Além disso, a correta identificação de elementos e eventos GM depende do conhecimento da sequência que foi inserida no genoma da planta que deve estar disponível em bases de dados atualizadas.

Há necessidade de ampliar as pesquisas para o desenvolvimento de métodos com alta eficiência para detecção de múltiplos alvos e utilizar modelos matemáticos e algoritmos que permitam a conversão de resultados analíticos em indicação da presença de OGMs numa amostra desconhecida (QUERCI et al., 2010). Nesse sentido, estudos futuros devem desenvolver plataformas de multidetecção, placas de PCR com múltiplos alvos e prontas para o uso, acopladas a base de dados atualizadas para correta identificação de elementos e eventos GM.

REFERÊNCIAS

ACHARJEE, S., SARMAH, B.K., KUMAR, P.A., OLSEN, K., MAHON, R., MOAR, W.J., MOORE, A., HIGGINS, T.J.V. Transgenic chickpeas (*Cicer arietinum* L.) expressing a sequence-modified *cry2Aa* gene. **Plant Science**, v.178, p.333–339, 2010.

AGBIOS. Agriculture and Biotechnology Strategies. GMO Database. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php>>. Acesso em: 15 mar. 2011.

ALARY, R.; SERIN, A.; MAURY, D.; BEN JOUIRA, H.; SIRVEN, J.-P.; GAUTIER, M.-F.; JOUDRIER, P. Comparison of simplex and duplex real-time PCR for the quantification of GMO in maize and soybean. **Food Control**, v.13, p. 235-244, 2002.

ANDERSON, H.M, ALLEN, J.R., GROAT, J.R., JOHNSON, S.C., KELLY, R.A., KORTE, J., RICE, J.F. Corn plant and seed corresponding to transgenic event MON89034 and methods for detection and use thereof. **United States Patent Application** 2008/0260932 A1, 2008.

ANKLAM, E.; GADANI, F.; HEINZE, P.; PIJNENBURG, H.; EEDE, G.V.D. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, n.214, p. 3-26, 2002.

ARUMUGANATHAN, K., EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Report**, v.9, p.208-218, 1991.

BARBETA, B.L., MARSHALL, A.T., GILLON, A.D., CRAIK, D.J.; ANDERSON, M.A. Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.105, n.4, p.1221-1225, 2008.

BARROS, N.E.F.; OLIVEIRA, E.M.M.; MARIN, V.A. Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados

em alimentos. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.21, n.1, p. 85-92, 2008.

BATS Report. Agency for Biosafety Research and assessment of technology impact of Swiss priority program biotechnology of Swiss national science foundation. **Foods derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods**, 2003. Disponível em: <<http://www.gmowatch.org>>. Acesso em: 10 abr. 2008.

BELLOQUE, J.; GARCIA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L. Analysis of soybean proteins in meat products: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n.42, p.507–532, 2002.

BERÓN, C.M., CURATTI, L., SALERNO, G.L. New Strategy for identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, n.2, p.761–765, 2005.

BOTHA, G.M.; VILJOEN, C.D.F. South Africa: A case study for voluntary GM labelling. **Food Chemistry**, n.112, p.1060–1064, 2009.

BRANQUINHO, M.R., FERREIRA, R.T.B., CARDARELLI, P. Survey of compliance with labeling legislation in food containing GMOs in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, n.23, p.220–225, 2010.

BRASIL. Decreto nº 4.680, 24 de abril de 2003. Regulamenta o acesso à informação (Lei n. 8078, 11 de setembro de 1990) concernente a alimentos e ingredientes contendo ou produzidos de organismos geneticamente modificados. **D.O.U. Diário Oficial da União**, Brasília-DF, Brasil. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>, Acesso em: 15 mar. 2008.

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei

no 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória no 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5o, 6o, 7o, 8o, 9o, 10 e 16 da Lei no 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. **D.O.U. Diário Oficial da União**, Brasília-DF, Brasil. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11992.html>>, Acesso em: 20 ago. 2009.

BROD, F.C.A.; ARISI, A.C.M. Recombinant DNA in meat additives: Specific detection of Roundup Ready™ soybean by nested PCR. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.87, p.1980-1984, 2007.

BROD, F.C.A.; FERRARI, C.S.; VALENTE, L.L.; ARISI, A.C.M. Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. **LWT Food Science and Technology**, n.40, p.748–751, 2007.

BROD, F.C.A.; ARISI, A.C.M. Quantification of Roundup Ready™ soybean in Brazilian soy-derived food by real-time PCR. **International Journal of Food Science and Technology**, n.43, p.1027-1032, 2008.

BURLINGAME, B.; PINEIRO, M. The essential balance: Risks and benefits in food safety and quality. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 20, p.139-146, 2007.

BURNS, J.M., NIXON, G.J., FOY, C.A., HARRIS, N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. **BMC Biotechnology**, v.5, p.31, 2005.

BURNS, M., VALDIVIA, H. A procedural approach for the identification of sources of uncertainty associated with GM quantification and real-time quantitative PCR measurements. **European Food Research and Technology**, v.226, p.7-18, 2007.

CANADIAN FOOD AUTHORITY. Decision Document DD2008-74: Determination of the Safety of Monsanto Canada Inc.'s Corn (*Zea mays* L.) Event MON 89034, 2009. Disponível em: <<http://ceragmc.org/docs/decdocs/08-192-001.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

CANKAR, K.; RAVNIKAR, M.; ZEL, J.; GRUDEN, K.; TOPLAR, N. Real-time polymerase chain reaction detection of Cauliflower mosaic virus to complement the 35S screening assay for critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **BMC Biotechnology**, v.6, p.37-51, 2006.

CARDARELLI, P.; BRANQUINHO, M.R.; FERREIRA, R.T.B.; DA CRUZ, F.P.; GEMAL, A.L. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. **Food Control**, n.16, p.859-866, 2005.

CENTER FOR FOOD SAFETY (CFS). Genetically engineered crops and foods: worldwide regulation and prohibition. Washington, DC, 2006. Disponível em: <<http://www.centerforfoodsafety.org>>. Acesso em: 19 abr. 2011.

CHIUEH, L.C.; CHEN, Y.L.; YU, J.H.; SHIH, D.Y.C. Detection of four types of genetically modified maize by polymerase chain reaction and immuno-kit methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.9, n.1, p.50-57, 2001.

CLAPPER, G., CANTRILL, R. Certification report - Certified Reference Materials AOCS 0906-A and AOCS 0906-B Report of the certification process for Conventional and MON89788 Soybean Seed Certified Reference Materials. AOCS, Urbana, IL, USA, 2007. Disponível em: <<http://www.aocs.org/files/TechnicalPDF/MON89788%20Final%20Report.pdf>>. Acesso em 04 out 2010.

CLAPPER, G., CANTRILL, R. Certification report - The certification of Conventional, Roundup Ready[®], Bollgard[®], and Bollgard II[®] Cottonseed Reference Materials AOCS 0804-A, AOCS 0804-B, AOCS 0804-C, AOCS 0804-D. Champaign, IL, USA, 2009. Disponível em: <<http://www.aocs.org/files/TechnicalPDF/0804ABCD%20report.pdf>>. Acesso em 25 maio 2010.

CLAPPER, G., CANTRILL, R. Certification report – The certification of conventional and MON88017 Corn Certified Reference Materials AOCS 0406-A and AOCS 0406-D. Champaign, IL, USA, 2009. Disponível em:

<<http://www.aocs.org/files/TechnicalPDF/0406AD%20report.pdf>>. Acesso em 25 maio 2010.

CORBISIER, P., BHAT, S., PARTIS, L., XIE, V.R.D., EMSLIE, K.R. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, n.6, p.2143–2150, 2010.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.62, n.3, p.807–813, 1998.

CTNBIO. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Commercial Approvals. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br>>. Acesso em: 20 mar. 2011.

DAVISON, J. GM plants: Science, politics and EC regulations. **Plant Science**, v.178, p.94–98, 2010.

DAVOLOS, C., GUIDELLI-THULER, A.M., ABREU, I.L., SENA, J.A.D., LEMOS, M.V.F. *CryI* genes from *Bacillus thuringiensis*: specificity determination and implications for primer design. **Biotechnology Letters**, v.31, p.1891–1897, 2009.

DE MAAGD, R.A., BRAVO, A., CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v.17, p.193-199, 2001.

DEMEKE, T., JENKINS, G.R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, p.1977–1990, 2010.

DINON, A. Z. **Deteção por PCR de milho geneticamente modificado (MON810) em farinha de milho, fubá, biju e polenta**. 2007. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

DINON, A. Z.; MELO, J. E.; ARISI, A. C. M. Monitoring of MON810 genetically modified maize in food in Brazil from 2005 to 2007. **Journal of Food Composition and Analysis**, n.21, p.515-518, 2008.

ELENIS, D.S.; KALOGIANNI, D.P.; GLYNOU, K.; IOANNOU, P.C.; CHRISTOPOULOS, T.K. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, n.392, p.347–354, 2008.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) n.1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC. **Official Journal European Union**, L268, 2003.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) n. 641/2004 of the European Parliament and of the Council of 6 April 2004 on detailed rules for the implementation of Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the application for the authorisation of new genetically modified food and feed, the notification of existing products and adventitious or technically unavoidable presence of genetically modified material which has benefited from a favourable risk evaluation. **Official Journal European Union**, L 102/14, 2004a.

EUROPEAN COMMISSION. Commission recommendation (EC) n.787/2004 of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No. 1830/2003. **Official Journal of European Union**, L 348, 18-26, 2004b.

EUROPEAN COMMISSION. Food and feed safety. Genetically modified food and feed. List of GMOs authorized in the EU. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm>. Acesso em 27 mar. 2011.

EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES (ENGL), 2008. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical

Methods of GMO Testing. Version 13-10-2008, Disponível em: <<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc>>. Acesso em 20 out. 2010.

FANTOZZI, A., ERMOLLI, M., MARINI, M., BALLA, B., QUERCI, M., VAN DEN EEDE, G. Innovative Application of Fluorescent Microsphere Based Assay for Multiple GMO Detection. **Food Analytical Methods**, v. 1, p. 10–17, 2008.

FEINBERG, M.; FERNANDEZ, S.; CASSARD, S.; CHARLES-DELOBEL, C. Quantification of the 35S promoter in maize DNA extracts from genetically modified organisms using real-time polymerase chain reaction. Part 2: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v.88, n.2, p.558-573, 2005.

FERNANDEZ, S; CHARLES-DELOBEL, C; GELDREICH, A.; BERTHIER, G.; BOYER, F.; COLLONNIER, C.; COUÉ-PHILIPPE, G.; DIOLEZ, A.; DUPLAN, M.N.; KEBDANI, N.; ROMANIUK, M.; FEINBERG, M.; BERTHEAU, Y. Quantification of the 35S promoter in DNA extracts from genetically modified organisms using real-time polymerase chain reaction and specificity assessment on various genetically modified organisms. Part 1: Operating procedure. **Journal of AOAC International**, v.88, n.2, p. 547-557, 2005.

FERRARI, C. S.; VALENTE, L.L.; BROD, F.C.A.; TAGLIARI, C.; SANT'ANNA, E.S.; ARISI, A.C.M. Evaluation of polymerase chain reaction and DNA isolation protocols for detection of genetically modified soybean. **International Journal of Food Science and Technology**, n.42, p.1249-1255, 2007.

FOTI, N.; ONORI, R.; DONNARUMMA, E.; DE SANTIS, B.; MIRAGLIA, M. Real-time PCR multiplex methods for the quantification of Roundup Ready soybean in raw material and processed food. **European Food Research and Technology**, v.222, p.209-216, 2006.

GERMINI, A.; ROSSI, STEFANO; ZANETTI, A.; CORRADINI, R.; FOGHER, C.; MARCHELLI, R. Development of a peptide nucleic acid array platform for the detection of genetically modified organisms in food. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p.3958–3962, 2005.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. **Food Control**, n.16, p.753-759, 2005.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Presence of genetically modified maize and soy in food products sold commercially in Brazil from 2000 to 2005. **Food Control**, n.19, p.499-505, 2008.

GRYSON, N.; MESSENS, K.; DEWETTINCK, K. Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.84, p.1357-1363, 2004.

GUO, J., YANG, L., CHEN, L., MORISSET, D., LI, X., PAN, L., ZHANG, D. MPIC: A High-Throughput Analytical Method for Multiple DNA Targets. **Analytical Chemistry**. v.83, p.1579-1586, 2011.

HAMELS, S., GLOUDEN, T., GILLARD, K., MAZZARA, M., DEBODE, F., FOTI, N., SNEYERS, M., NUEZ, T.E., PLA, M., BERBEN, G., MOENS, W., BERTHEAU, Y., AUDÉON, C., VAN DEN EEDE, G., REMACLE, J. A PCR-microarray method for the screening of genetically modified organisms. **Journal of European Food Research Technology**, v.228, n.4, p.531-541, 2009.

HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J., P. WILLIAMS, M. Real time quantitative PCR. **Genome Methods**, v.6, p.986-994, 1996.

HERNÁNDEZ, M.; ESTEVE, T.; PRAT, S.; PLA, M. Development of real-time PCR systems based on SYBR Green I and TaqMan technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. **Journal of Cereal Science**, n.39. p.99-107, 2004.

HIRD, H.; POWELL, J.; JOHNSON, M.L.; OEHLISCHLAGER, S. Determination of percentage of Roundup Ready soy in soy flour using real time polymerase chain reaction: interlaboratory study. **Journal of AOAC Internacional**. v.86, p.66-71, 2003.

HOFTE, H., WHITELEY, H.R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**, v.53, n.2 ,p.242-255, 1989.

HOLCK, A., PEDERSEN, B.O., HEIR, E. Detection of five novel GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis. **European Food Research and Technology**, v.231, n.3, p.475-483, 2010.

HOLST-JENSEN, A.; RONNING, S.B.; LOVSETH, A.; BERDAL, K.G. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical Bioanalytical Chemistry**, n.375, p.985–993, 2003.

HOLSTEN-JENSEN, A.; BERDAL, K.G. The molecular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. **Journal of AOAC International**, v.87, n.4, p.927-936, 2004.

HOLST-JENSEN, A., DE LOOSE, M., VAN DEN EEDE, G. Coherence between Legal Requirements and Approaches for Detection of Genetically Modified Organisms (GMOs) and Their Derived Products. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.54, p.2799-2809, 2006.

HOLST-JENSEN, A. GMO testing-trade, labeling or safety first? **Nature Biotechnology**, n.26, p.858–859, 2008.

HOLST-JENSEN, A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v.27, p.1071–1082, 2009.

HUANG, H.Y.; PAN, T.M. Detection of genetically modified m and NK603 by multiplex and real-time polymerase chain reaction methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3264-3268, 2004.

HUANG, C.C.; PAN, T.M. Event-specific real-time detection and quantification of genetically modified roundup ready soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.3833-3839, 2005.

HUBNER, P.; STUDER, E.; LUTHY, J. Quantification of genetically modified organisms in food. **Nature Biotechnology**, v.17, p.1137-1138, 1999.

HUBNER, P., WAIBLINGER, H.U., PIETSCH, K., BRODMANN, P. Validation of PCR Methods for quantification of genetically modified plants in food. **Journal of AOAC International**, v.84, p.1855-1864, 2001.

JAMES, C. GMO global status. **ISAAA**, International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications. Disponível em: <<http://www.isaaa.org>>. Acesso em: 10 mar. 2009.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. **ISAAA**, International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications. Disponível em: <<http://www.isaaa.org>>. Acesso em: 11 mar. 2011.

JAPAN. Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries. Food and Marketing Bureau. **Notification n. 1775**. Tokyo, Japan, 2000.

JOINT RESEARCH CENTRE (JRC). Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON89034 using Real-time PCR. Protocol, 21 Oct., 2008a. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MON89034_validated_Method.pdf> Acesso em 22 Junho 2010.

JOINT RESEARCH CENTRE (JRC). Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON89034 using Real-time PCR. Validation report, 21 Oct., 2008b. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MON89034_validated_Method.pdf>. Acesso em 22 junho 2010.

JOINT RESEARCH CENTRE (JRC). Event-specific Method for the Quantification of Cotton Line MON15985 using Real-time PCR. Protocol, 19 June 2008c. Disponível em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MON15985_validated_Method.pdf>. Acesso em 22 junho 2010.

KAY, S.; VAN DEN EEDE, G. The limits of GMO detection. **Nature Biotechnology**, v.19, p.405, 2001.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Model systems for developing detection methods for foods deriving from genetic engineering. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.10, p.28-35, 1997.

KOREA. Ministry of Agriculture and Forestry. **Notification n. 2000-31**. Seoul, Korea, 2000.

KURIBARA, H.; SHINDO, Y.; MATSUOKA, T.; TAKUBO, K.; FUTO, S.; AOKI, N.; HIRAO, T.; AKIYAMA, H.; GODA, Y.; TOYODA, M.; HINO, A. Novel reference molecules for quantification of genetically modified maize and soybean. **Journal of AOAC International**, v.85, n.5, p.1077-1089, 2002.

KWIATEK, K.; SIERADZKI, Z.; MAZUR, M. Prevalence of genetically modified crops in animal feeding stuffs in Poland - Three year studies. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.51, n.4, p.609-613, 2007.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v.23, p.2947-2948, 2007.

LEE, B., KIM, C.G., PARK, J.Y., PARK, K.W., KIM, H.J., YI, H., JEONG, S.C., YOON, W.K., KIM, H.M. Monitoring the occurrence of genetically modified soybean and maize in cultivated fields and along the transportation routes of the Incheon Port in South Korea. **Food Control**, v.20, p.250-254, 2009.

LEIMANIS, S., HAMELS, S., NAZE, F.; MBONGOLO MBELLA, G., SNEYERS, M., HOCHEGGER, R., BROLL, H., ROTH, L., DALLMANN, K., MICSINAI, A., PAZ, J.L.L.; PLA, M., BRUNEN-NIEWELER, C., PAPAZOVA, N., TAVERNIERS, I., HESS, N., KIRSCHNEIT, B., BERTHEAU, Y., AUDEON, C., LAVAL, V., BUSCH, U., PECORARO, S., NEUMANN, K., ROSEL, S., VAN DIJK, J., KOK, E., BELLOCCHI, G., FOTI, N., MAZZARA, M., MOENS, W., REMACLE, J., VAN DEN EEDE, G. Validation of the performance of a GMO multiplex screening assay based on microarray

detection. **European Food Research Technology**, n.227, p.1621–1632, 2008.

LIPP, M., et al. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of AOAC International**, v.88, n.1, p.136-155, 2005.

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. **Journal of AOAC International**, v.82, p.923-928, 1999.

MAFRA, I.; SILVA, S.A.; MOREIRA, E.J.M.O.; SILVA, C.S.F.; BEATRIZ, M.; OLIVEIRA, P.P. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. **Food Control**, n.19, p.1183-1190, 2008.

MANO, J., SHIGEMITSU, N., FUTO, S., AKIYAMA, H., TESHIMA, R., HINO, A., FURUI, S., KITTA, K. Real-Time PCR array as a universal platform for the detection of genetically modified crops and its application in identifying unapproved genetically modified crops in Japan. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n.57, p.26–37, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plantas geneticamente modificadas autorizadas para produção comercial no Brasil. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/vegetal/organismos-geneticamente-modificados/plantas-autorizadas>>. Acesso em: 16 mar. 2011.

MARGARIT, E.; REGGIARDO, M. I.; VALLEJOS, R. H.; PERMINGEAT, H. R. Detection of Bt transgenic maize in foodstuffs. **Food Research International**, v.39, p.250–255, 2006.

MARMIROLI, N.; MAESTRI, E.; GULLÌ, M.; MALCEVSCHI, A.; PEANO, C.; BORDONI, R.; DE BELLIS, G. Methods for detection of GMOs in food and feed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.392, p.369–384, 2008.

MATSUOKA, T.; KURIBARA, H.; TAKUBO, K.; AKIYAMA, H.; MIURA, H.; GODA, Y.; KUSAKABE, Y.; ISSHIKI, K.; TOYODA, M.; HINO, A. Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2100-2109, 2002.

MBELLA, E.G.M., LIEVENS, A., BARBAU-PIEDNOIR, E., SNEYERS, M., LEUNDA-CASI, A., ROOSENS, N., VAN DEN BULCKE, M. SYBR (R) Green qPCR methods for detection of endogenous reference genes in commodity crops: a step ahead in combinatory screening of genetically modified crops in food and feed products. **European Food Research and Technology**, v.232, p.485-496, 2011.

MEYER, R.; JACCAUD, E. Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. In: **Proceedings of the European Food Chemistry**, IX Conference, Interlaken, Switzerland Event n. 220, v.1, p.23-28, 1997.

MICHELINI, E.; SIMONI, P.; CEVENINI, L.; MEZZANOTTE, L.; RODA, A. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.392, p.355-367, 2008.

MORISSET D, STEBIH D, CANKAR K, ŽEL J, GRUDEN K. Alternative DNA amplification methods to PCR and their application in GMO detection: a review. **European Food Research Technology**, v.227, p.1287-1297, 2008.

MORIUCHI, R.; MONMA, K.; SAGI, N.; UNO, N.; KAMATA, K. Applicability of quantitative PCR to soy processed foods containing Roundup Ready Soy. **Food Control**, v.18, p.191-195, 2007.

NOVAK, P.K., GRUDEN, K., MORISSET, D., LAVRAC, N., STEBIH, D., ROTTER, A., ZEL, J. GMOTrack: generator of cost-effective GMO testing strategies. **Journal of AOAC International**, v.92, n.6, p.1739-46, 2009.

OLEXOVÁ, L.; DOVICOVICOVÁ, L.; KUČHTA, T. Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. **European Food and Research Technology**, v.218, p.390-393, 2004.

ONISHI, M.; MATSUOKA, T.; KODAMA, T.; KASHIWABA, K.; FUTO, S.; AKIYAMA, H.; MAITANI, T.; FURUI, S.; OGUCHI, T.; HINO, A. Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.9713-9721, 2005.

ORABY, H.A.S.; HASSAN, A.A.; MOSSALLAM, A.A.A. Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3' terminator. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p.1974-1980, 2005.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LAVALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, V.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B.; KISHORE, G.M. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Science**, v.35, n.5, p.1451-1461, 1995.

PAULI, U.; LINIGER, M.; SCHROTT, M. Quantitative detection of genetically modified soybean and maize: modified evaluation in a Swiss ring trial. **Mitten Lebensmitteln Hygenic**, v.92, p.145-158, 2001.

PERMINGEAT, H.R.; REGGIARDO, M.I.; VALLEJOS, R.H. Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.4431-4436, 2002.

PORCAR, M., JUAREZ-PEREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Review**, v.26, p.419-432, 2003.

PRINS, T.W.; VAN DIJK, J.P.; BEENEN, H.G.; VAN HOEF, A.M.A.; VOORHUIZEN, M.M.; SCHOEN, C.D.; AARTS, H.J.M.; KOK, E.J. Optimised padlock probe ligation and microarray detection of multiple

(non-authorised) GMOs in a single reaction. **BMC Genomics**, v.9, p.584, 2008.

PRINS, T.W.; VAN DIJK, J.P.; VAN HOEF, A.M. A.; VOORHUIJZEN, M.M.; BROEDERSB, S.; TRAPMANNB, S.; SEYFARTH, R.; PARDIGOLD, A.; SCHOENE, C.D.; AARTS, H.J.M.; KOK, E.J. Towards a multiplex cereal traceability tool using padlock probe ligation on genomic DNA. **Food Chemistry**, v.118, p.966-973, 2010.

QUERCI, M.; MAZZARA, M. The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. Session 7. **Joint Research Centre**, 2004. Disponível em: <<http://gmotraining.jrc.rtdocs/session%2004.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2009.

QUERCI, M., FOTI, N., BOGNI, A., KLUGA, L., BROLL, H., VAN DEN EEDE, G. Real-time PCR-based ready-to-use multi-target analytical system for GMO detection. **Food Analytical Methods** v.2, p.325–336, 2009.

QUERCI, M., VAN DEN BULCKE, M., ŽEL, J., VAN DEN EEDE, G., BROLL, H. New approaches in GMO detection. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.396, p.1991–2002, 2010.

QUIRASCO, M.; SCHOEL, B.; CHHALLIYIL, P.; FAGAN, J.; GÁLVEZ, A. Real-time and conventional PCR detection of Liberty Link® rice varieties and transgenic soy in rice sampled in the Mexican and American retail markets. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.392, p.395-404, 2008.

RANJEKAR, P.K.; PATANKAR, A.; GUPTA, V.; BHATNAGAR, R.; BENTUR, J.; KUMAR, P.A. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. **Current Science**, n.84, p.321-329, 2003.

RODRÍGUEZ-LÁZARO D, LOMBARD B, SMITH H, RZEZUTKA A, D'AGOSTINO M, HELMUTH R, SCHROETER A, MALORNY B, MIKO A, GUERRA B, DAVISON J, KOBILINSKY A, HERNÁNDEZ M, BERTHEAU Y, COOK N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified

organisms. **Trends in Food Science and Technology**, v.18, p.306–319, 2007.

RUTTINK, T., DEMEYER, R., GULCK, E., DROOGENBROECK, B., QUERCI, M., TAVERNIERS, I., LOOSE, M. Molecular toolbox for the identification of unknown genetically modified organisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, p.2073–2089, 2010.

SCHOLTENS, I.M.J., KOK, E.J., HOUGS, L., MOLENAAR, B., THISSEN, J.T.N.M., VAN DER VOET, H. Increased efficacy for in-house validation of real-time PCR GMO detection methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, p.2213-2227, 2010.

SHINDO, Y.; KURIBARA, H.; MATSUOKA, T.; FUTO, S.; SAWADA, C.; SHONO, J.; AKIYAMA, H.; GODA, Y.; TOYODA, M.; HINO A. Validation of real-time PCR analysis for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. **Journal of AOAC International**, v.85, n.5, p.1119-1126, 2002.

SINGH, C.K., OJHA, A., BHATANAGAR, R.K., KACHRU, D.N. Detection and characterization of recombinant DNA expressing *vip3A*-type insecticidal gene in GMOs - standard single, multiplex and construct-specific PCR assays. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.390, p.377–387, 2008.

SOMMA, M.; QUERCI, M. The Polymerase Chain Reaction (PCR). In: The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. Session 6. **Joint Research Centre**, 2004. Disponível em: <<http://gmotraining.jrc.it/docs/session%2005.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2009.

SONG, S., ZHOU, G., GAO, F., ZHANG, W., QIU, L., DAI, S., XU, X., XIAO, H. Degradation of transgene DNA in genetically modified herbicide-tolerant rice during food processing. **Food and Chemical Toxicology**, 2011, doi:10.1016/j.fct.2011.08.003.

STANDARD A18/1.5.2. Australia New Zealand Food Authority, User Guide – Labelling Genetically Modified Food. Disponível em:

<http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/user_guide_GM_labeling_0817.pdf>. Acesso em: 19 abril 2011.

SZEMES, M.; BONANTS, P.; DE WEERDT, M.; BANER, J.; LANDEGREN, U.; SCHOEN, C.D. Diagnostic application of padlock probes—multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. **Nucleic Acids Research**, v.33, n.8, 2005.

TAN, F., ZHU, J., TANG, J., TANG, X., WANG, S., ZHENG, A., LI, P. Cloning and characterization of two novel crystal protein genes, *cry54Aa1* and *cry30Fa1*, from *Bacillus thuringiensis* strain BtMC28. **Current Microbiology**, v.58, p.654–659, 2009.

TASKI-AJDUKOVIC, K.; NIKOLICA, Z.; VUJAKOVICA, M.; MILOSEVICA, M.; IGNJATOVA, M.; PETROVICA, D. Detection of genetically modified organisms in processed meat products on the Serbian food market. **Meat Science**, v.81, p.230-232, 2009.

TAVERNIERS, I.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.378, p.1198-1207, 2004.

TAYLOR, M., HARTNELL, G., NEMETH, M., LUCAS, D., DAVIS, D. Comparison of broiler performance when fed diets containing grain from second-generation insect-protected and glyphosate-tolerant, conventional control or commercial reference corn. **Poultry Science**, v.86, p.1972–1979, 2007.

TERRY, C.F.; HARRIS, N.; PARKES, H.C. Detection of GM crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. **Journal of AOAC International**, v.85, n.3, p.768-774, 2002.

TRAPMANN, S., CATALANI, P., CONNEELY, P., CORBISIER, P., GANCSBERG, D., HANNES, E.L.E., GUERN, L., KRAMER, G.N., PROKISCH, J., ROBOUCH, P., SCHIMMEL, H., ZELENY, R., PAUWELS, J. The certification of reference materials of dry-mixed soya powder with different mass fractions of Roundup ready soya IRMM-410S. European Commission, Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium, 2002.

Disponível em: <http://www.erm-crm.org/ERM_products/search/reports/BF410a.pdf>. Acesso em 04 out. 2010.

TRAPMANN, S., CONNEELY, P., CONTRERAS, M., CORBISIER, P., GANCSBERG, D., HANNES, E., GIORIA, S., MUÑOZ-PINEIRO, A., VAN NYEN, M., SCHIMMEL, H., SZILAGY, S., EMONS, H. Certification Report - The certification of reference materials of dry-mixed maize powder with different mass fractions of 1507 maize certified reference materials ERM[®]-BF418. European Commission, Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium, 2005. Disponível em: <http://www.erm-crm.org/ERM_products/search/reports/BF418a.pdf>. Acesso em 04 out. 2010.

TUNG NGUYEN, C. T.; SON, R.; RAHA, A. R.; LAI, O. M.; WONG, V. L.C.M. Detection of Genetically Modified Organisms (GMOs) using molecular techniques in food and feed samples from Malaysia and Vietnam. **Internacional Food Research Journal**, v.15, n.2, p.155-166, 2008.

UJHELYI, G.; VAJDA, B.; BÉKI, E.; NESZLÉNYI, K.; JAKAB, J.; JÁNOSI, A.; NÉMEDI, E.; GELENCSÉR, E. Surveying the RR soy content of commercially available food products in Hungary. **Food Control**, v.19, p.967-973, 2008.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. Pesticide Fact Sheet of MON-89Ø34-3 x DAS- Ø15Ø7-1 x MON-88Ø17-3 x DAS-59122-7, 2009. Disponível em: <<http://cera-gmc.org/docs/decdocs/09-211-001.pdf>>. Acesso em 10 jan. 2011.

VAITILINGOM, M.; PIJNENBURG, H.; GENDRE, F.; BRIGNON, P. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.5261–5266, 1999.

VAN DEN BULCKE, M., LIEVENS, A., BARBAU-PIEDNOIR, E., MBONGOLO MBELLA, E.G., ROOSENS, N., SNEYERS, M., LEUNDA-CASI, A. A theoretical introduction to “Combinatory SYBR-Green qPCR Screening”, a matrix-based approach for the

detection of materials derived from genetically modified plants. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.396, p.2113–2123, 2010.

VILJOEN, D.D.; DAJEE, B.K.; BOTHA, G.M. Detection of GMO in food products in South Africa: Implications of GMO labeling. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.2, p.73-82, 2006.

VOLLENHOFER, S.; BURG, K.; SCHMIDT, J.; KROATH, H. Genetically modified organisms in food - Screening and specific detection by polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.5038–5043, 1999.

WAIBLINGER, H.U., GROHMANN, L., MANKERTZ, J., ENGELBERT, D., PIETSCH, K. A practical approach to screen for authorized and unauthorised genetically modified plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, p.2065–2072, 2010.

WANG, X.M., TENG, D., YANG, Y.L., TIAN, F., GUAN, Q.F., WANG, J.H. Construction of a reference plasmid molecule containing eight targets for the detection of genetically modified crops. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, n.2, p.721-731, 2011.

WEIGHARDT, F. GMO quantification in processed food and feed. **Nature Biotechnology**, v.25, n.11, p.1213-14, 2007.

WEIGHARDT, F.; BARBATI, C.; PAOLETTI, C.; QUERCI, M.; KAY, S.; DE BEUCKELEER, M.; VAN DEN EEDE, G. Real-time PCR based approach for quantification of the *pat* gene in the T25 *Zea Mays* event. **Journal of AOAC International**, v.87, n.6, p.1342-55, 2004.

WISEMAN G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International**, v.85, n.3, p.792-796, 2002.

WOLF, C.; SCHERZINGER, M.; WURZ, A.; PAULI, U.; HÜBNER, P.; LÜTHY, J. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. **European Food Research and Technology**, v.210, p.367–372, 2000.

YAMAGUCHI, H.; SASAKI, K.; UMETSU, H.; KAMADA, H. Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan. **Food Control**, v.14, p.201-206, 2003.

YU, J.; PENG, P.; ZHANG, X.; ZHAO, Q.; ZHY, D.; SUN, X.; LIU, J.; AO, G. Seed-specific expression of a lysine rich protein sb401 gene significantly increases both lysine and total protein content in maize seeds. **Molecular Breeding**, v.14, p.1-7, 2004.

ZHOU, X.; LIU, W.; LIAN, J.; ZHANG, W. Monitoring of Roundup™ Ready soybean in Guangdong province in China. **Food Control**, v.18, p.1219-1222, 2007.

ZIMMERMANN, A.; HEMMER W.; LINIGER M.; LÜTHY, J.; PAULI, U. A sensitive detection method for genetically modified MaisGard™ corn using a nested PCR-system. **LWT - Food Science and Technology**, v.31, p.664-667, 1998.

APÊNDICE A – **Table S1:** material suplementar com dados do artigo do capítulo 4.

A *cryIA.105* detection in 9 PCR runs

ng/PCR	Copies/PCR										Ct		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mean	SD	
150	55046	23.77	25.08	25.58	25.66	25.80	26.81	27.03	26.23	25.21	25.72	0.73	
		23.87	24.91	25.43	25.25	25.66	25.81	24.85	25.78	24.54			
30	11009	25.66	26.03	26.28	25.94	26.07	25.98	25.70	26.24	25.67	25.96	0.29	
		25.59	25.99	26.24	25.93	26.15	26.18	25.57	26.51	25.58			
6	2202	28.38	28.45	28.45	28.26	28.34	28.45	28.09	28.68	28.21	28.34	0.24	
		28.06	28.33	28.58	28.31	28.65	28.48	27.91	28.60	28.10			
1.2	440	30.29	30.51	30.79	30.56	30.63	30.98	30.40	30.72	30.45	30.62	0.15	
		30.16	30.55	30.72	30.68	30.53	30.71	30.58	30.68	30.54			
0.6	220	31.12	31.74	31.66	31.19	31.29	31.39	31.05	31.52	31.23	31.42	0.25	
		31.07	31.51	32.08	31.27	31.79	31.68	31.31	31.88	31.44			
0.25	88	32.53	32.78	32.75	32.16	32.21	32.91	32.41	32.57	32.19	32.58	0.36	
		32.51	32.74	32.84	32.55	32.66	32.88	32.43	33.43	32.52			
0.05	18	35.59	35.52	35.10	34.87	34.71	35.23	34.58	35.31	35.16	35.40	0.58	
		35.38	34.90	36.82	35.35	35.51	36.15	35.64	35.99	34.76			
			35.36	36.19	36.07	35.52	35.19	35.15	35.84	35.90			
			35.20	36.42	35.24	35.33	34.67	35.95	34.79	35.03			
			35.79	34.99	36.03	35.77	35.70	35.57	35.61	35.11			
			35.21	35.63	34.58	35.25	35.91	34.48	37.24	35.32			
			35.26	35.38	34.93	35.57	34.25	35.67	35.40	34.99			
			36.25	35.81	34.69	34.87	37.44	34.90	35.87	34.54			
			37.04	39.17	37.24	36.22	38.71	37.33	36.84	39.65			36.98
			ND	ND	38.63	39.45	ND	ND	36.40	37.99			38.14
				38.29	ND	38.10	38.78	36.68	36.90	38.11			36.69
				37.42	42.25	36.80	37.66	ND	37.25	37.62			ND
		39.21	37.91	37.23	38.36	37.91	36.79	38.21	37.73				
		ND	ND	36.47	37.94	37.22	35.55	37.26	ND				
		37.73	ND	37.06	38.18	40.01	38.47	ND	37.88				
		ND	ND	38.38	38.89	39.58	35.56	ND	ND				

B *cry2Ab2* detection in 9 PCR runs

ng/PCR	Copies/PCR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Ct Mean	SD		
150	55046	24.70	23.54	24.55	24.02	23.80	24.07	23.89	23.68	23.54	23.75	0.65		
		25.08	23.27	24.27	23.58	23.67	22.55	23.11	23.44	22.71				
30	11009	26.82	25.61	25.83	25.69	25.74	25.56	25.82	25.81	25.36	25.74	0.40		
		26.68	25.65	25.75	25.44	25.34	25.50	25.66	25.50	25.54				
6	2202	29.03	28.12	28.21	27.98	27.87	27.64	27.94	27.99	27.80	28.13	0.35		
		28.96	27.87	28.15	28.10	28.10	28.26	28.21	27.92	28.18				
1.2	440	31.76	30.72	30.78	30.57	30.60	30.52	30.74	30.38	30.72	30.68	0.43		
		31.78	30.62	30.48	30.67	30.18	30.40	30.50	30.38	30.44				
0.6	220	32.28	31.57	31.57	31.53	31.37	31.47	31.08	30.93	31.40	31.50	0.39		
		32.56	31.49	31.39	31.53	31.15	31.71	31.47	31.37	31.20				
0.25	88	33.58	32.24	32.84	32.57	33.03	32.69	32.68	32.60	32.54	32.76	0.42		
		34.02	32.67	32.57	32.72	32.59	32.70	32.46	32.60	32.58				
0.05	18	35.95	34.60	34.67	33.70	35.17	34.37	34.90	35.85	34.53	35.35	0.76		
		36.60	34.94	35.70	35.35	37.23	34.81	35.21	34.47	34.23				
		34.59	35.78	34.59	35.99	35.37	ND	34.65	35.30					
		35.75	35.91	35.46	35.66	35.52	ND	35.57	34.90					
		34.35	36.97	34.64	34.21	35.27	ND	35.50	34.85					
		36.19	35.39	36.19	36.12	36.43	ND	34.98	35.23					
		35.01	35.77	34.86	37.79	35.88	34.69	36.41	36.66					
		35.13	35.33	35.67	35.16	34.86	35.13	35.31	36.55					
		39.06	ND	ND	36.45	36.34	ND	ND	36.56	37.75			37.16	0.88
		38.94	37.97	ND	36.43	37.65	36.55	36.85	36.10	38.28				
	36.11	39.13	35.87	37.29	36.97	36.17	37.77	37.80						
	37.61	36.44	ND	ND	ND	37.24	36.36	ND						
	ND	ND	ND	37.67	38.84	ND	37.14	36.84						
	ND	36.39	37.75	36.94	35.78	37.72	38.59	36.95						
	37.76	ND	ND	ND	36.70	35.87	ND	35.61						
	ND	ND	36.48	36.74	ND	33.92	36.33	37.78						

*ND = not detected

**Outliers are in bold and they were not included in the analysis