

ANDRÉIA ZILIO DINON

DETECÇÃO POR PCR DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO
(MON810) EM FARINHA DE MILHO,
FUBÁ, BIJU E POLENTA

FLORIANÓPOLIS

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

DETECÇÃO POR PCR DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO
(MON810) EM FARINHA DE MILHO,
FUBÁ, BIJU E POLENTA

ANDRÉIA ZILIO DINON

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos do Departamento de Ciência e
Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em
Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

FLORIANÓPOLIS

Maio de 2007

DETECÇÃO POR PCR DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO
(MON810) EM FARINHA DE MILHO,
FUBÁ, BIJU E POLENTA

Por

Andréia Zílio Dinon

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela Comissão formada por:

Presidente: _____
Ana Carolina Maisonnave Arisi (UFSC)

Membro: _____
João Roberto Oliveira do Nascimento (USP)

Membro: _____
Elane Schwinden Prudencio (UFSC)

Coordenador: _____
Marilde Terezinha Bordignon Luiz (UFSC)

Florianópolis, 24 de maio de 2007.

AGRADECIMENTOS

À Jeová Deus, pela força ativa da vida.

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

Ao meu grande e único irmão Fabrício, pelo companheirismo, tolerância e apoio ao dividirmos juntos o mesmo lar.

À professora Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela calorosa acolhida neste projeto, orientação incansável, sempre disposta e bem-humorada.

Às professoras Dra. Edna Regina Amante e Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz, pelo acesso a equipamentos do laboratório.

À amiga Jaqueline Elis de Melo, pela valiosa parceria e auxílio na realização deste trabalho.

A todos os professores, colegas de laboratório e novos amigos, especialmente: Caroline Tagliari, Márcia Regina Pelisser, Jaciara Zarppelon Mazzo e Fábio Angonesi Brod por todos os conhecimentos compartilhados e agradável companheirismo.

Aos estagiários Josiana Rita Bazana e Gilberto Arcanjo Maróstica, pela oportunidade de contribuir em seus estágios curriculares.

À 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 Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Fundação de Pesquisa e Amparo de Santa Catarina (FAPESC) pelo financiamento deste trabalho.

“O aluno não está acima do seu instrutor, mas
todo aquele que for perfeitamente instruído
será semelhante ao seu instrutor”
(Lucas 6:40).

DINON, A. Z. **Detecção 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.

RESUMO

Neste trabalho, o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizado para detecção do milho geneticamente modificado (GM) em amostras de alimentos comercializados no Brasil (farinha de milho, fubá, biju e polenta) e para duas amostras de alimentos comercializados na Argentina (farinha de milho e polenta). O método da PCR foi usado para detecção do promotor CaMV 35S (P35S) e do gene *cryIA(b)* em 64 amostras de alimentos. A *nested* PCR foi usada para o monitoramento da presença de MON810 em 81 amostras. O DNA das amostras de milho foi extraído com brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), e a presença do DNA amplificável do milho foi evidenciada pela amplificação dos genes da invertase e da zeína. Todas as amostras foram positivas para amplificação do gene da zeína, entretanto a amplificação do gene da invertase não apresentou boa reprodutibilidade para a maioria das amostras analisadas. No total das 64 amostras brasileiras analisadas para detecção do promotor 35S e do gene *cryIA(b)*, 1 foi positiva para ambos, gene *cryIA(b)* e promotor P35S, e 19 amostras foram positivas para o gene *cryIA(b)*. A sensibilidade da *nested* PCR para a detecção do MON810 foi 0,1 %. No total das 81 amostras brasileiras analisadas para a detecção de MON810, nenhuma foi positiva. Ambas as amostras argentinas foram positivas para presença de P35S, gene *cryIA(b)* e MON810. Os resultados demonstraram a presença em uma amostra do promotor P35S e do gene *cryIA(b)*, a presença em 18 amostras do gene *cryIA(b)* e ausência do milho GM MON810 nas amostras analisadas de alimentos comercializados no Brasil entre 2005 e 2007.

Palavras-chave: reação em cadeia da polimerase, análise de DNA, milho geneticamente modificado, MON810, P35S, gene *cryIA(b)*.

DINON, A. Z. **Detection by PCR of genetically modified maize (MON810) in maize flour, corn meal, maize flour flakes and polenta.** 2007. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

ABSTRACT

In the present investigation, polymerase chain reaction (PCR) method has been adopted in order to detect genetically modified (GM) maize in food samples sold commercially in Brazil (maize flour, corn meal, maize flour flakes and polenta) and two food samples sold commercially in Argentina (maize flour and polenta). PCR method was used for the detection of CaMV 35S promoter (P35S) and *cryIA(b)* gene in 64 food samples. *Nested* PCR method was used for monitoring the presence of MON810 in 81 food samples. DNA was extracted using CTAB from maize containing food samples and the presence of maize amplifiable DNA was evidenced by the amplification of invertase and zein gene fragments. All analyzed samples were positive for zein gene amplification however amplification of invertase gene had not a good reproducibility for most analyzed samples. Out of 64 Brazilian samples examined for P35S and *cryIA(b)* detection, one sample was positive for both P35S and *cryIA(b)* gene and 18 samples were positive for *cryIA(b)* gene. The sensitivity of *nested* PCR for MON810 detection was 0.1 %. Out of 81 Brazilian samples examined for MON810 detection, none was positive. For two Argentinean samples, both were positive for P35S, *cryIA(b)* gene and MON810. Results demonstrate the presence of P35S and *cryIA(b)* gene in one sample, *cryIA(b)* gene in 18 samples and absence of MON810 GM maize in analyzed samples of food products sold in Brazil from 2005 to 2007.

Key words: PCR analysis, DNA detection, GM maize, MON810, P35S, *cryIA(b)* gene.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para detecção por PCR dos genes da zeína e da invertase do milho, do promotor P35S e do gene <i>cryIA</i> (b)	42
Tabela 2 - Detecção do gene <i>cryIA</i> (b) e do promotor P35S em produtos comerciais	48
Tabela 3 - Iniciadores utilizados para detecção do gene da zeína do milho e do milho GM MON810	57
Tabela 4 - Detecção do milho GM MON810 em alimentos derivados de milho	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas de industrialização do milho no processo a seco	18
Figura 2 - Etapas de industrialização do milho no processo a úmido	19
Figura 3 - Diagrama esquemático de quatro diferentes linhagens de milho GM: (A) Bt 11; (B) Event 176; (C) MON 810; (D) LIBERTY	24
Figura 4 - Representação das etapas da PCR para amplificação de DNA	31
Figura 5 - Diagrama esquemático dos fragmentos de DNA recombinante do milho MON810 amplificados por <i>nested</i> PCR	32
Figura 6 – Seqüência N-terminal de 216 pb e seqüência resultante de aminoácidos do gene cryIA(b) introduzido nas linhagens de milho GM Event 176, Bt11, MON810 e MON802, respectivamente	35
Figura 7 - Detecção de DNA amplificável de milho por PCR com os iniciadores IVR1-F/IVR1-R	44
Figura 8 - Detecção de DNA amplificável de milho por PCR com iniciadores ZEO1/ZEO2	45
Figura 9 - Detecção do fragmento de 152 pb com os iniciadores CryIA-F/CryIA-R através da PCR	46
Figura 10 - Detecção do fragmento de 123 pb com os iniciadores p35Scf3/p35Scr4 através da PCR	47
Figura 11 - Detecção de DNA amplificável do milho por PCR com os iniciadores ZEO1/ZEO2	59
Figura 12 - Detecção do milho MON810 por <i>nested</i> PCR com os iniciadores mg1/mg2 e mg3/mg4	60
Figura 13 - Sensibilidade da <i>nested</i> PCR para MON810 utilizando concentrações decrescentes de DNA do padrão MON810 1 % em diluições seriadas (1:10, v/v) em água	61
Figura 14 - Sensibilidade da <i>nested</i> PCR para MON810 utilizando DNA de padrões MON810 adicionado ao DNA de cada amostra não GM	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIMILHO - Associação Brasileira das Indústrias de Milho

AGBIOS - Agencia de Informações em Biotecnologia

BET – Brometo de etídeo

Bt – *Bacillus thuringensis*

CaMV 35S – Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CTAB - Brometo de cetiltrimetil amônio

CTNBIO – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DNA - Ácido desoxiribonucléico

D.O. – Densidade ótica

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

ELISA – Enzyme Linked Imunosorbent Assay

EPA – *Environmental Protection Agency*

FDA – *Food and Drug Administration*

GM – Geneticamente modificado

IBOPE – Instituto Brasileiro de Pesquisa Estatística

IRMM - Instituto de Materiais de Referência e Medida

OGM – Organismo Geneticamente Modificado

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

P35S – promotor 35S

RR – *Roundup Ready*

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SDS – dodecil sulfato de sódio

TBE – Tampão Tris-borato-EDTA

TE – Tampão Tris-EDTA

USDA – United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1	16
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE MILHO	17
1.2 BENEFICIAMENTO DO MILHO	17
1.3 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE GRÃOS GM	19
1.4 MILHO GM	21
1.5 RISCOS E BENEFÍCIOS DE ALIMENTOS GM	24
1.6 ROTULAGEM DE ALIMENTOS CONTENDO OGM	26
1.7 DETECÇÃO DE OGM EM ALIMENTOS	27
1.7.1 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS	27
1.7.2 DETECÇÃO DE DNA	28
1.7.3 EXTRAÇÃO DNA	29
1.7.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO	29
1.7.5 AMPLIFICAÇÃO POR PCR	30
1.7.6 <i>NESTED</i> PCR	31
1.7.7 PCR MULTIPLEX	32
1.7.8 PCR EM TEMPO REAL	33
1.7.9 INICIADORES PARA PCR DO MILHO	33
1.7.10 MATERIAL DE REFERÊNCIA	36
1.7.11 AMOSTRAGEM	36
CAPÍTULO 2	38
2 DETECÇÃO DO PROMOTOR CAMV 35S E DO GENE <i>CRYIA</i> (B)	39
RESUMO	39
2.1 INTRODUÇÃO	40
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.2.1 AMOSTRAGEM	41
2.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA	41
2.2.3 INICIADORES	42
2.2.4 CONDIÇÕES DA PCR	42
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
2.3.1 DETECÇÃO DO GENE DA INVERTASE	43
2.3.2 DETECÇÃO DO GENE DA ZEÍNA	45

2.3.3 DETECÇÃO DO GENE <i>CRYIA</i> (B)	45
2.3.4 DETECÇÃO DO P35S	47
2.3.5 DETECÇÃO DO MILHO GM	48
2.4 CONCLUSÃO	49
2.5 REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO 3	53
3 MONITORAMENTO DA PRESENÇA DO MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO MON810 EM ALIMENTOS DERIVADOS DE MILHO	54
RESUMO	54
3.1 INTRODUÇÃO	55
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
3.2.1 AMOSTRAS	56
3.2.3 EXTRAÇÃO DE DNA	56
3.2.4 CONDIÇÕES DA PCR	56
3.2.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	58
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.4 CONCLUSÃO	63
AGRADECIMENTOS	63
3.5 REFERÊNCIAS	63
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
APÊNDICES	67
APÊNDICE A – INFORMAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE FARINHA DE MILHO (F) E FUBÁ (A).	68
APÊNDICE B – INFORMAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE BIJU (B) E POLENTA (P)	69
APÊNDICE C – FLUXOGRAMA PARA EXTRAÇÃO DE DNA	70
APÊNDICE D – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA	71
APÊNDICE E – DENSIDADE ÓTICA DO DNA EXTRAÍDO PARA DIFERENTES AMOSTRAS	72
6 REFERÊNCIAS	74

INTRODUÇÃO

A produção mundial de grãos tem aumentado exponencialmente desde 1990 e atualmente uma parcela desta produção é composta de grãos geneticamente modificados (GM), ou grãos transgênicos, como são comumente denominados (JAMES, 2006).

Organismos geneticamente modificados (OGMs) são produzidos a partir da técnica do DNA recombinante que consiste na inserção, no genoma da planta, de um ou mais genes de forma a garantir a expressão das características de interesse. As duas razões principais que envolvem o desenvolvimento de OGMs são a melhoria da qualidade e o aumento da produtividade das plantas, incluindo o aumento das propriedades funcionais e nutricionais, a tolerância a herbicidas, a resistência a insetos e a doenças (ANKLAM et al., 2002; KISHORE; SHEWMAKER, 1999).

O milho GM denominado milho Bt, resistente a insetos parasitas do milho e tolerante ao herbicida glufosinato de amônio, é uma das principais espécies transgênicas cultivadas mundialmente (JAMES, 2006). As linhagens de milho GM que contêm diferentes seqüências do gene sintético *cryIA(b)*, previamente autorizados para comércio na Argentina e na Europa, foram: Event 176, MON810 e Bt11. O gene *cryIA(b)* presente nas linhagens de milho GM MON810 e Bt11 está sob o controle de um promotor constitutivo forte, o promotor 35S ou P35S (MATSUOKA et al., 2002). No Brasil, o plantio e a comercialização de variedades de milho GM ainda não estão autorizados, somente está autorizado o plantio de soja GM Roundup ReadyTM (BRASIL, 2005).

A importação e a exportação de grãos são fatores importantes para economia brasileira e estão sujeitas à observância de acordos, leis e decretos. Em janeiro de 2000, em Montreal, no Canadá, foi assinado por 176 países o Protocolo de Cartagena ou Protocolo Internacional de Biossegurança, o qual permite um controle maior sobre OGMs, pois impõe condições para o comércio internacional, onde os pontos principais são o princípio de precaução e a rotulagem dos produtos transgênicos. O referido protocolo traz garantias ao país importador de recusar o produto, caso não esteja acompanhado de estudo de risco adequado, e atribuir responsabilidades em caso de danos (NODARI; GUERRA, 2003).

O decreto n°. 4680 de abril de 2003 estabelece que o consumidor deve ser informado quando houver presença acima do limite de 1 % OGM através da rotulagem do produto (BRASIL, 2003). Com a entrada em vigor deste decreto, todos os produtos alimentícios contendo milho devem ser analisados a fim de averiguar a presença de DNA recombinante. O não cumprimento da legislação vigente poderá trazer barreiras para o comércio de alimentos

em nível nacional e internacional. Aliado a isso está o direito do consumidor obter informação clara e correta quanto ao alimento que irá adquirir através da identificação no rótulo do produto. Esse direito é assegurado por lei e desrespeitá-lo representa infração legal que gera sérios prejuízos sociais e econômicos para todos os envolvidos. Por outro lado, o atendimento a legislação contribuirá para ampliar o comércio e a rastreabilidade dos alimentos além de garantir ao consumidor liberdade de escolha.

Os métodos para detecção de OGM em grãos baseados na detecção de proteínas com anticorpos, já estão bem estabelecidos (MIRAGLIA et al., 2004). Entretanto, em muitos alimentos a fonte protéica constitui-se em uma mistura de diferentes matérias-primas o que inviabiliza ou dificulta a detecção (PAN, 2002; SOMMA; QUERCI, 2004; ERMOLLI et al., 2006). Os métodos baseados na detecção de DNA, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), são eficientes até mesmo para amostras altamente processadas, quando o DNA está fragmentado, como geralmente ocorre nos alimentos industrializados (TENDEL et al., 2001).

Análises realizadas por Greiner, Konietzny, Villavicencio (2005) em alimentos processados comercializados no Brasil (18 amostras de farinha de milho, 12 amostras de produtos de padaria, 18 de polenta e 14 de salgadinhos de milho) revelaram a presença de material transgênico. Foram identificadas as linhagens transgênicas Bt11 e MON810, em 22% das amostras de polenta, 17 % dos produtos de padaria, 11 % das amostras de farinha de milho e 7 % dos salgadinhos de milho analisados no ano de 2001. Cardarelli et al. (2005) avaliaram 89 alimentos contendo milho e soja comercializados no Brasil, 25 foram positivos para presença do gene da zeína de milho, 20 foram positivos para amplificação do promotor 35S usando os iniciadores p35Scf3/p35Scr4 e em nenhum deles foi constatada a presença das linhagens transgênicas MON810 e Event176.

Uma vez que poucos estudos de monitoramento da presença de OGM em alimentos foram realizados no Brasil, há necessidade de ampliar pesquisas para detecção de OGM em alimentos processados (GREINER, KONIETZNY, VILLAVICENCIO, 2005; CARDARELLI et al., 2005; BROD et al., 2007).

Este trabalho teve por objetivo geral avaliar através de PCR a presença de milho geneticamente modificado em amostras de farinha de milho, fubá, biju e polenta (flocos de milho pré-cozido) comercializadas no Estado de Santa Catarina, bem como em duas amostras comercializadas na Argentina (uma amostra de farinha de milho e uma amostra de polenta). Os objetivos específicos foram testar o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) para a extração de DNA das amostras derivadas de milho, adequar o

método de PCR para a detecção do promotor CaMV 35S, do gene *cryIA(b)* e da linhagem específica de milho GM MON810.

A apresentação deste trabalho foi estruturada na forma de capítulos. O capítulo 1 destaca a revisão bibliográfica. O capítulo 2 aborda a detecção por PCR do promotor CaMV35S e do gene *cryIA(b)* em alimentos à base de milho e o capítulo 3 destaca o monitoramento da presença do milho geneticamente modificado MON810 por *nested* PCR em alimentos comercializados no Brasil. Os capítulos 2 e 3 foram escritos no formato de artigo. Após estes capítulos encontram-se as considerações finais, apêndices e as referências relativas ao capítulo de revisão.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Produção e comercialização de milho

A produção global de milho projetada para 2006/2007 é de 682,13 milhões de toneladas e a exportação de 77,9 milhões de toneladas, onde quatro maiores produtores de milho (Estados Unidos, China, União Européia e Brasil) serão responsáveis por mais de 72 % da produção mundial (NETO, 2006a).

Estados Unidos (EUA) é o maior produtor de milho, sua produção foi de 282,26 milhões de toneladas entre 2005/2006 sendo 52,71 milhões de toneladas destinadas à exportação (NETO, 2006a). Os EUA também desenvolvem um programa de bioenergia que irá demandar mais de 30 milhões de toneladas de milho para processamento de biocombustível. A China, o segundo país com maior produção de milho, em torno de 114 milhões de toneladas/ano, cada vez mais destina a sua produção para o mercado interno. Com a redução dos excedentes de produção dos principais países, surge a oportunidade para que produtores brasileiros possam participar com maiores volumes nas exportações mundiais (TAVARES, 2004). Na Argentina, a produção de milho entre 2004/2005 foi de 14 milhões de toneladas sendo 9 milhões de toneladas destinadas à exportação (NETO, 2006a).

A produção brasileira estimada para 2006/2007 é de 51,1 milhões de toneladas. A importação de milho em 2005/2006 foi de 450 mil toneladas e a exportação foi de 3,856 milhões de toneladas (CONAB, 2007). As exportações brasileiras de milho em janeiro/2007 totalizaram 463 mil toneladas. A previsão da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), no levantamento de janeiro, é que as exportações de milho em 2007 superem 5 milhões de toneladas (GUIMARÃES; ALVES, 2007).

Santa Catarina, que é o quinto estado brasileiro com a maior produção de milho, correspondendo a 9 % da produção nacional, foi responsável pela colheita de 4,31 milhões de toneladas na safra 2003/2004 (NETO, 2004). A safra de 2007 deverá alcançar 3,6 milhões de toneladas a partir de um plantio em 705 mil hectares (NETO, 2006b).

1.2 Beneficiamento do milho

A industrialização do milho é feita através de dois processos: a seco e a úmido. No processo a seco, o milho, após limpeza e secagem, é degerminado e separado em endosperma

e germe. O endosperma é moído e classificado para a obtenção de produtos finais (farinha, fubá, creme, gritz, sêmolas), já o germe passa por processo de extração para produção de óleo e farelo (Figura 1). Após a degerminação, o cereal pode ser pré-cozido e flocado e dar origem ao biju ou flocos de milho pré-cozidos, ou ainda moído e extrusado para obter as farinhas de polenta pré-cozida (ABIMILHO, 2007).

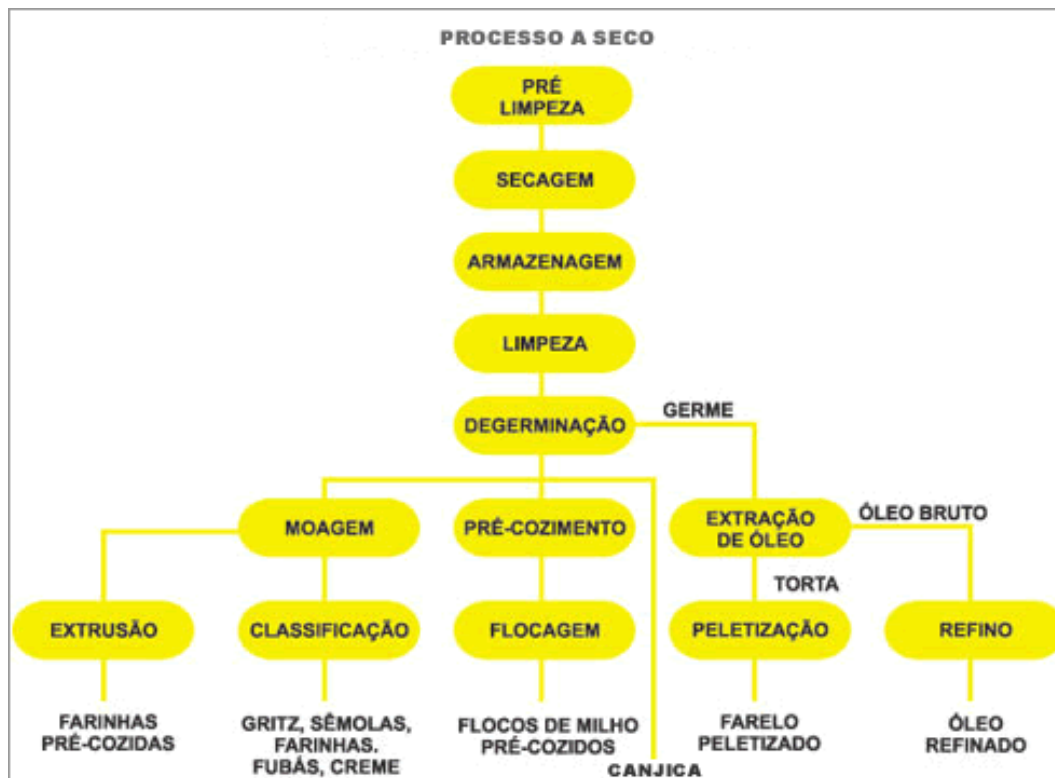


Figura 1 - Etapas de industrialização do milho no processo a seco (ABIMILHO, 2007).

No processo a úmido, após limpeza e secagem, o milho é macerado, separado em germe, fibras e endosperma, o qual é separado em amido e glúten. O amido ainda é convertido em xaropes e modificado em dextrinas e amidos especiais. O glúten é seco e recebe a incorporação das fibras e do farelo para composição de rações animais conforme esquema na Figura 2 (ABIMILHO, 2007).



Figura 2 - Etapas de industrialização do milho no processo a úmido (ABIMILHO, 2007)

Os principais produtos obtidos a partir do milho e vendidos diretamente ao consumidor são: creme, farinha, farinha pré-cozida flocada (biju), farinha pré-cozida (polenta), flocos de milho, fubá, canjiquinha, canjica (branca e amarela), polenta pré-cozida, pipoca, salgadinhos, cuscuz, angu, óleo de milho refinado, amidos pré-gelatinizados empregados nos cereais matinais, alimentos infantis e sopas instantâneas (ABIMILHO, 2007).

O amido de milho entra ainda na composição de diversos alimentos infantis, doces, balas, sucos, molhos, sopas, vegetais enlatados, bebidas achocolatadas e produtos de panificação. Na forma de xarope, o milho transforma-se em matéria-prima para sorvetes, geléias, gomas de mascar, licores e sobremesas (ABIMILHO, 2007).

1.3 Produção e comercialização de grãos GM

Desde 1994, o plantio de OGMs tem se expandido mundialmente. Entre 2005 e 2006, a área global de cultivo de OGMs aumentou 13% o equivalente a 12 milhões de hectares. As principais espécies transgênicas cultivadas mundialmente em 2006 foram a soja (58,6 milhões de hectares), o milho (25,2 milhões de hectares), o algodão (13,4 milhões de hectares) e a canola (4,8 milhões de hectares). Entre os países com as maiores áreas cultivadas com transgênicos destacam-se os EUA, a Argentina, o Brasil, o Canadá, a Índia e

a China. No Brasil, 11,5 milhões de hectares foram destinados ao cultivo de soja e algodão transgênicos em 2006 (JAMES, 2006).

Os principais países responsáveis pela produção e comercialização de milho GM são Estados Unidos, Argentina e Canadá, mas também se destacam, com menores áreas cultivadas, África do Sul, Uruguai, Espanha, Filipinas, Honduras. Houve aumento de mais de cinco vezes, de aproximadamente 1.500 hectares em 2005 para cerca de 8.500 hectares em 2006, na área plantada de milho Bt nos cinco países da União Européia - França, República Tcheca, Portugal, Alemanha e Eslováquia (JAMES, 2006). No Brasil, o plantio de milho GM para fins comerciais não está autorizado, somente está autorizado o plantio de soja GM (BRASIL, 2005).

Na Europa existe um forte receio dos consumidores em relação aos grãos GM e as legislações são bastante restritivas quanto ao seu cultivo e importação (CAVALI, 2001; GRUÈRE, 2006). Na União Européia, o limite máximo para não rotular um produto como geneticamente modificado é 0,9% de OGMs. É obrigatória a rotulagem para alimentos destinados ao consumo humano e animal, produtos expostos em restaurantes e derivados de ingredientes GM mesmo com quantidades não detectáveis de proteínas transgênicas, como óleo de soja e milho, xaropes e lecitina de soja (GRUÈRE, 2006). Nos EUA, embora a recente legislação não exija a rotulagem, o governo recomenda fazê-la voluntariamente, exigindo apenas que as empresas produtoras de alimentos contendo OGMs notifiquem órgãos reguladores, como FDA, USDA e EPA, antes do novo produto ser comercializado (THOMSON, 2003; GRUÈRE, 2006).

No Brasil, o Instituto Brasileiro de Pesquisa Estatística (IBOPE), em pesquisa de opinião pública, registrou que os brasileiros, caso pudessem escolher entre um alimento transgênico e um alimento não transgênico, em sua maioria, 74% dos entrevistados, escolheriam produtos não transgênicos. A mesma pesquisa, registrou que 91% dos brasileiros querem que os produtos transgênicos apresentem rotulagem (IBOPE, 2001). Assim, o atendimento das legislações nacionais e internacionais bem como avanços nos sistemas de detecção de OGMs em alimentos são importantes para ampliar oportunidades de comércio interno e fortalecer a exportação de produtos brasileiros (TAVARES, 2004).

1.4 Milho GM

A produção do milho GM utiliza a tecnologia do DNA recombinante e baseia-se na transformação genética através da inserção no genoma da planta de uma ou mais seqüências, geralmente isoladas de espécies diferentes, de forma a garantir a expressão do(s) gene(s) de interesse (ANKLAM et al., 2002).

A construção de OGMs para expressar determinada proteína normalmente utiliza três elementos básicos no cassete de expressão: o promotor, que controla a expressão da proteína recombinante 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 disso, pode ser adicionado um gene marcador que serve para selecionar as células que, de fato, foram transformadas (MARCELINO et al., 2003). O elemento promotor mais utilizado é o CaMV 35S, promotor derivado do vírus fitopatogênico do mosaico da couve-flor, e o elemento terminador mais utilizado é o NOS, derivado do gene da nopalina sintase do plasmídeo Ti da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Estes dois elementos estão presentes na maioria das plantas GM (MEYER, 1999; WOLF et al., 2000).

Existem diversas linhagens de milho GM que apresentam diferentes cassetes de expressão (LIPP et al., 1999; TENDEL et al., 2001; 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 e tolerância a herbicidas é a mais comum e esse tipo de modificação geralmente resulta na expressão de dois transgenes: *cry1A(b)* e *bar/pat* (MATSUOKA et al., 2002; YAMAGUCHI et al., 2003; JAMES, 2006).

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

O efeito inseticida ocorre provavelmente pela ligação específica das proteínas Cry sobre receptores intestinais do inseto o que causa vazamento de íons e dano osmótico das células, até à desintegração do mesentério e morte do inseto. Esse 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 (LOGUERCIO, CARNEIRO, CARNEIRO, 2002; 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 *cryIA(b)*, *cryIA(c)* e *cry9C* que codificam toxinas efetivas aos insetos da ordem lepidóptera (CTNBio, 2003; BATS, 2003; CRICKMORE et al., 1995).

Os genes *bar*, derivado da bactéria do solo *Streptomyces higroscopicus*, e *pat*, derivado da bactéria do solo *Streptomyces viridochromogenes*, codificam a enzima pat ou fosfinotricina acetiltransferase que promove tolerância ao herbicida glufosinato de amônio pela inativação da L-fosfinotricina, componente ativo do herbicida (QUERCI e MAZZARA, 2004; WEHRMANN et al., 1996). As linhagens de milho GM T25 e Bt11 apresentam o gene *pat* (MATSUOKA et al., 2002).

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

O número de linhagens transgênicas aprovados em todo mundo é crescente. A linhagem que mais tem recebido aprovação regulatória no mundo é o de soja RR (*Roundup Ready*) tolerante a herbicida, seguida pelo milho resistente a inseto (MON810) e o milho tolerante a herbicida (NK603) (JAMES, 2006). Mais de 21 linhagens de milho GM são cultivadas e comercializadas como alimento humano e/ou animal nos EUA. Na União Européia são 12 linhagens de milho aprovadas, 8 na Argentina e 2 no Uruguai, que incluem as linhagens: MON810 e Bt11 (AGBIOS, 2007). As quatro linhagens mais cultivadas de milho GM tolerante a insetos e resistente a herbicidas são Bt11, Event 176, MON810 e LIBERTY (YAMAGUCHI et al., 2003; GREINER, KONIETZNY, VILLAVICENCIO, 2005).

O milho Bt11, desenvolvido pela Novartis (*Syngenta Seeds Mycogen Corporation*), empresa Suíça, expressa os dois genes *cryIA(b)* e *bar* (Figura 3-A), localizado em diferentes construções, que estão sob o controle do promotor 35S e do terminador NOS (MATSUOKA et al., 2002).

O milho Event 176 (Novartis, Suíça; *Syngenta Seeds Mycogen Corporation*) expressa os genes *cryIA(b)* e *bar* (Figura 3-B). O gene *cryIA(b)* é expresso no milho, sob o controle do promotor da fosfoenolpiruvato carboxilase (P-PEPC) e no pólen, sob o controle do promotor da proteína kinase cálcio-dependente (P-CDPK). O terminador utilizado é o T35S derivado do vírus do mosaico da couve-flor (T-CaMV 35S) e inclui a seqüência de

intron 9 do gene fosfoenolpiruvato-carboxilase do milho (PEPC Intr.#9). A expressão do gene *bar* está sob o controle do promotor 35S (P35S) e do terminador 35S (T35S) do vírus do mosaico da couve flor. A comercialização do milho Bt 176 foi aprovada nos EUA em 1995 e na Europa em 1997 tanto para ração animal como para processamento industrial (QUERCI; MAZZARA, 2004).

A linhagem MON810 (Figura 3-C), desenvolvida pela Monsanto no Canadá, expressa o gene *cryIA(b)* sob o controle do promotor 35S derivado do vírus do mosaico da couve-flor (P-CaMV 35S), seqüência de íntron hsp 70 e terminador NOS (T-nos) (YAMAGUCHI et al., 2003). O gene *cryIA(b)* está truncado, ou seja, a inserção ocorreu de forma incompleta na linhagem 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 plantio e a comercialização desta linhagem também foram aprovados na Argentina, Austrália, Japão, África do Sul e Suíça (QUERCI e MAZZARA, 2004).

As linhagens T14 e T25, que correspondem a modificações genéticas do milho LIBERTY-Link foram desenvolvidas pela *Bayer/Aventis CropScience* (AgrEvo). Ambas expressam os genes *bar* e *pat* sob o controle do promotor 35S e dos terminadores NOS e 35S, respectivamente (MATSUOKA et al., 2002; YAMAGUCHI et al., 2003).

A construção Bt11 possui o terminador NOS, enquanto Event 176 e LIBERTY possuem o terminador 35S. Dentre as quatro linhagens citadas, excetuando-se o milho Event 176, todas possuem em comum o promotor 35S. Exceto a linhagem LIBERTY, as demais possuem o gene *cryIA(b)* conforme mostra a Figura 3 (YAMAGUCHI et al., 2003). Na linhagem MON810 o gene *cryIA(b)* está sob o controle de um promotor forte (P35S) e isso resulta na forte expressão desse gene em todos tecidos do milho (MATSUOKA et al., 2002; MARGARIT et al., 2006).

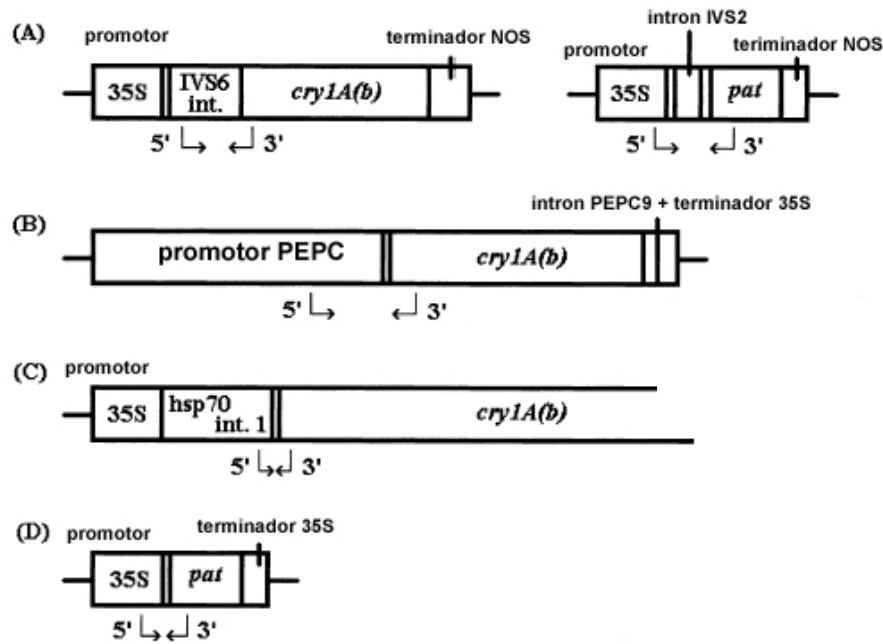


Figura 3 - Diagrama esquemático de quatro diferentes linhagens de milho GM: (A) Bt 11; (B) Event 176; (C) MON 810; (D) LIBERTY (adaptado de YAMAGUCHI et al., 2003).

1.5 Riscos e benefícios de alimentos GM

O desenvolvimento de plantas GM visa melhorar a qualidade e a produtividade dos alimentos. Contudo, modificações no material genético da planta, incluindo a expressão de novos genes, levantam questões polêmicas que exigem uma avaliação cuidadosa de riscos e benefícios destes alimentos principalmente para o homem e para o meio ambiente (NODARI; GUERRA, 2003).

O aumento da produtividade das lavouras GM pode ser apontado como um benefício das espécies GM resistentes a insetos e tolerantes a herbicidas (MALARKEY, 2003). Isso ocorre pela resistência das plantas ao ataque de doenças causadas por vírus, fungos, bactérias e insetos as plantações. Outra vantagem é o uso de apenas um tipo de inseticida ou pesticida com conseqüente redução de riscos de contaminação humana, animal e ambiental (JOUANIN et al., 1998; THOMSON, 2003). Outros benefícios são a produção em larga escala para atender as necessidades do crescimento populacional e do aumento da expectativa de vida; plantas com crescimento rápido e menos susceptíveis a doenças; alimentos mais saborosos e nutritivos; aumento da vida de prateleira; maior proteção de grãos armazenados contra insetos e redução nos níveis de micotoxinas (UZOGARA, 2000; CELEC et al., 2005).

Há muitas críticas contra alimentos GM, por parte de consumidores e grupos ecológicos protecionistas, países que possuem restrições ao comércio de alimentos GM e produtores orgânicos, devido à visão da nova tecnologia como uma ameaça à agricultura mundial, a saúde e a ecologia (UZOGARA, 2000).

O desenvolvimento da engenharia genética criou uma série de preocupações éticas, religiosas, ambientais e de segurança, como o levantamento de questões sobre a transferência da modificação genética ao consumidor do alimento GM; a alteração nos mecanismos de regulação da duplicação do DNA com efeitos indesejáveis e inesperados a nível celular; a imprecisão das técnicas para inserção do DNA nas plantas transformadas (AKHTER et al., 2001; SOLERI e CLEVELAND, 2006).

Embora diversos estudos de avaliação de risco dos alimentos GM já tenham sido realizados (HILBEC, 2001; DEAVILLE; MADDISON, 2005; GOGGI et al., 2006; NAKAJIMA et al., 2007), ainda há dúvidas quanto aos riscos da manipulação genética para saúde humana em questões sobre se a inserção do gene pode trazer efeitos adversos devido a presença de proteínas e outras substâncias tóxicas no alimento GM; risco de reação alérgica ao homem; ativação de genes anteriormente silenciados na planta convencional; transferência permanente de material genético para outros organismos; alteração da microbiota humana pelo consumo de alimentos GM; surgimento de bactérias resistentes a antibióticos; uso contínuo de determinados inseticidas e pesticidas que podem resultar no desenvolvimento de patógenos resistentes; além da transferência de resistência a espécies selvagens que podem afetar a biodiversidade e a integridade do ecossistema (AKHTER et al., 2001; LACK, 2002; MALARKEY, 2003). Um estudo realizado com animais alimentados com ração transgênica não detectou a presença de DNA recombinante em nenhum órgão ou tecido destes animais (FLACHOWSKY et al., 2007).

Existem ainda os riscos ecológicos, onde se destaca o fluxo gênico com parentes silvestres (THOMSON, 2003; GOGGI et al., 2006), como ocorreu com espécies selvagens de milho no México contaminadas pelo pólen do milho Bt cultivado nos EUA (QUIST; CHAPELA, 2001; BALTAZAR et al., 2005; SOLERI; CLEVELAND, 2006). Um efeito prejudicial da modificação genética que confere resistência a insetos está relacionado com a morte de outros insetos, além do inseto-alvo, o que pode gerar um desequilíbrio ecológico (THOMSON, 2003).

Uma estratégia utilizada para avaliar a segurança de um alimento GM está baseada no conceito de “Equivalência Substancial”. Isso inclui uma comparação entre o alimento modificado e seu correspondente convencional quanto às propriedades agrônômicas,

genéticas, morfológicas, físico-químicas e biológicas, a fim de estabelecer um grau de equivalência e avaliar os riscos anteriormente descritos (KUIPER; KETLER, 2003). Esta comparação permite o estabelecimento da segurança relativa para o alimento GM na avaliação dos riscos destes produtos (NODARI e GUERRA, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Food and Agriculture Organization (FAO) em 1995 e 1997 apresentaram princípios internacionais para segurança de alimentos. A análise da segurança dos alimentos GM inclui alguns princípios básicos, os quais são: análise do potencial de toxicidade e alergenicidade (pesquisa a relação entre o transgene e alérgenos conhecidos); ensaios *in vitro* com uso de enzimas, receptores de proteínas ou linhagens de culturas celulares (verifica o risco de o transgene induzir processos tóxicos a nível celular); experimentos *in vivo* com animais (simulam a resposta imunológica e endócrina esperada em humanos) (KÖNIG et al., 2004).

1.6 Rotulagem de alimentos contendo OGM

A Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, artigo 6º, parágrafo III e artigo 8º, do Código de Defesa do Consumidor garante ao cidadão o direito a informação sobre o produto através da rotulagem (BRASIL, 1990). Além de permitir o direito de livre escolha, a rotulagem possibilita a rastreabilidade, especialmente em casos de identificação e recolhimento de produtos com efeitos potenciais à saúde humana (NODARI; GUERRA, 2003).

Quanto à presença de grãos GM em alimentos para consumo humano ou animal, a Lei Federal nº. 11.105, de 14 de março de 2005 estabelece no artigo 40 que “os alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM ou derivados deverão conter essa informação em seus rótulos” (BRASIL, 2005). Enquanto o decreto nº. 4680, de 24 de abril de 2003 também especifica que: “na comercialização de alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, com presença acima do limite de um por cento do produto, o consumidor deverá ser informado da natureza transgênica desse produto” (BRASIL, 2003). Deste modo, torna-se obrigatória à identificação dos alimentos que contenham mais de 1% de organismos geneticamente modificados. Tanto nos produtos embalados como nos vendidos a granel deverá constar no rótulo a informação sobre a presença de transgênico, quando acima do limite de 1 %. Este mesmo decreto estabelece que os alimentos produzidos a partir de animais

alimentados com ração contendo ingredientes transgênicos deverão conter esta informação no rótulo (BRASIL, 2003).

1.7 Detecção de OGM em alimentos

Na detecção de OGM em alimentos é importante evitar a contaminação cruzada de amostras e de reagentes em termos do uso de espaço físico e equipamentos, se possível, exclusivos para detecção de OGM. Também, torna-se necessário o uso de controles positivos e negativos para garantir a precisão dos resultados obtidos (HÜBNER, STUDER, LUTHY, 1999).

Vários métodos para detecção de OGM em grãos já foram desenvolvidos, alguns baseados na detecção de proteínas e outros na detecção de DNA (VAN DUIJN et al., 1999; VOLLENHOFER et al., 1999; AHMED, 2002).

1.7.1 Detecção de Proteínas

Os métodos baseados na análise de proteínas (Western blot, ELISA, tiras de fluxo lateral) detectam a presença de proteínas recombinantes que podem ser produzidas durante certos estágios de desenvolvimento ou em apenas algumas partes da planta (MARKOULATOS et al., 2004; AHMED, 2002). O processamento industrial geralmente desnatura proteínas e dificulta o uso destes métodos na análise de alimentos processados (PAN, 2002; SOMMA e QUERCI, 2004; ERMOLLI et al., 2006). ERMOLLI et al. (2006) observaram que diferentes kits, além de apresentarem diferenças no limite de detecção, apresentam resultados distintos e, portanto, são necessárias a padronização e a validação desses resultados.

Chiueh et al. (2001) utilizaram tiras de fluxo lateral para análise das linhagens transgênicas MON810, Bt11 e Event 176 e encontraram boa especificidade e um limite de detecção de 2 %. Estes autores comprovaram também que o método ELISA possui menor sensibilidade do que a PCR convencional. Além disso, kits de detecção de proteínas são geralmente utilizados como métodos de triagem e não permitem a detecção específica e simultânea de diferentes linhagens transgênicas (CHIUEH et al., 2001; TRIPATHI, 2005).

Entretanto, Roda et al. (2006) mostraram resultados favoráveis para o método ELISA na detecção do milho transgênico MON810 através da triagem rápida e sensível da proteína CryIA(b).

1.7.2 Detecção de DNA

Os métodos baseados na detecção de DNA são eficientes até mesmo para amostras altamente processadas, quando o DNA está fragmentado, mas não seriamente degradado, como geralmente ocorre durante o processamento de alimentos (TENDEL et al., 2001). O DNA pode apresentar-se fragmentado no caso de alimentos cujo processamento inclui alterações no pH e o uso de alta temperatura como óleo refinado, proteína texturizada, farinhas pré-cozidas, flocos de milho pré-cozidos, por exemplo. Bauer et al. (2003) comprovou a fragmentação do DNA da farinha de milho GM Bt-176 após tratamento térmico a 85°C em pH 8,4 e a 65°C em pH 4,0 por 90 minutos. Contudo, foi possível a detecção de fragmentos de DNA de 957 pb característicos desta linhagem transgênica (BAUER et al., 2003). Outro estudo comprovou que ocorre maior degradação do DNA do milho durante o processamento com uso de calor em meio ácido (HUPFER et al., 1998).

A análise de DNA baseia-se na capacidade de detectar seqüências únicas de DNA recombinante ou endógeno da planta e gera resultados evento-específicos para plantas diferentes que expressam a mesma proteína recombinante. Além disso, permite a detecção e quantificação de plantas GM que não expressam nenhuma nova proteína devido ao silenciamento da expressão do gene. Nas amostras em que existe DNA recombinante, todo o DNA exógeno é, em princípio, susceptível a detecção: seqüências de promotores, genes de interesse introduzidos, sinais de terminação e genes marcadores usados para seleção das plantas modificadas em laboratório (HOLST-JENSEN et al., 2003).

Métodos para detecção de grãos GM baseados na amplificação do DNA recombinante através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são altamente específicos e sensíveis e podem ser aplicados para detecção de pequenas quantidades de DNA de uma grande variedade de amostras (ANKLAM et al., 2002; MARCELINO et al., 2003). A PCR é capaz de identificar material transgênico em uma amostra mesmo que ele represente apenas 0,1 % do alimento. Assim, é o método mais adequado para detecção de OGM em alimentos processados ou que sofreram tratamento térmico (AHMED, 2002).

O protocolo para análise de OGMs em alimentos, baseado na presença de DNA, segue algumas linhas gerais que incluem: extração e purificação do DNA da amostra, determinação da concentração de DNA extraído, amplificação do DNA por PCR com iniciadores específicos para seqüências presentes no OGM e eletroforese do DNA amplificado (SOMMA, 2004).

Um pré-requisito essencial para a detecção de OGMs em alimentos compreende o conhecimento do tipo de modificação genética, incluindo a construção genética do inserto e

elementos regulatórios (promotores e reguladores) que o flanqueiam. Para análise, é necessária uma quantidade mínima de amostra contendo DNA amplificável compreendendo a sequência de DNA alvo (SOMMA, 2004).

1.7.3 Extração DNA

A extração de DNA para análise de alimentos e ingredientes alimentares GM é um ponto crítico para todos os passos analíticos subsequentes, tanto para a detecção qualitativa como para a análise quantitativa. Assim, o método de extração deve assegurar a pureza e a qualidade do DNA extraído (ANKLAM et al., 2002). Geralmente, a extração de DNA de plantas visa à quebra da parede celular; a desintegração da membrana celular pelo uso de detergentes, como CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) ou SDS (dodecil sulfato de sódio), e a preservação da integridade dos ácidos nucleicos em soluções tampão de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) e Tris-HCl; inativação de nucleases endógenas pelo uso de detergentes e EDTA; inativação e degradação de proteínas pelo uso de enzimas como a proteinase K; separação de polissacarídeos inibidores e constituintes celulares hidrofóbicos, como lipídios e polifenóis, utilizando solventes orgânicos como clorofórmio; remoção do detergente e concentração do DNA com álcool e sais de precipitação (ANKLAM et al., 2002).

O protocolo baseado no uso do detergente CTAB é o mais utilizado para a extração de DNA de diferentes espécies vegetais, inclusive para o milho (JANKIEWICZ, BROLL e ZAGON, 1999; HUPFER et al., 1998; LIPP et al., 1999; HERNÁNDEZ et al., 2004; CARDARELLI et al., 2005; VALENTE, 2005). Esse detergente solubiliza as membranas, formando com o DNA um complexo que facilita a posterior precipitação de polissacarídeos e outros interferentes (ANKLAM et al., 2002). Outras opções de extração incluem o uso de diferentes colunas de sílica ligantes de DNA e kits de extração específicos com resultados de extração variáveis dependendo das condições de processamento do alimento (DI PINTO et al., 2007; SMITH; MAXWELL, 2007).

1.7.4 Quantificação do DNA extraído

A concentração de DNA em solução pode ser determinada através da medida direta da densidade ótica (DO) sob luz ultravioleta (UV). Os ácidos nucleicos apresentam pico de absorção de luz ultravioleta no comprimento de onda de 260nm e as proteínas a 280nm. A relação A_{260}/A_{280} é utilizada para estimar a pureza dos ácidos nucleicos. A solução pura de DNA apresenta uma relação A_{260}/A_{280} de aproximadamente 1,8. A absorção no comprimento

230 nm reflete contaminação da amostra por carboidratos, fenóis e compostos aromáticos (SOMMA, 2004).

1.7.5 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 seqüências específicas de DNA através de um par de oligonucleotídeos sintéticos denominados iniciadores (LIPP et al., 2005). Os iniciadores são artificialmente sintetizados, tendo como base uma seqüência de nucleotídeos complementares às seqüências que delimitam o fragmento de DNA a ser amplificado. A reação de amplificação é catalisada pela enzima *Taq* DNA polimerase que alonga o iniciador, quando este está ligado a uma fita simples de DNA molde, e gera uma cópia complementar da seqüência-alvo (ANKLAM et al., 2002).

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 (Figura 4). 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).

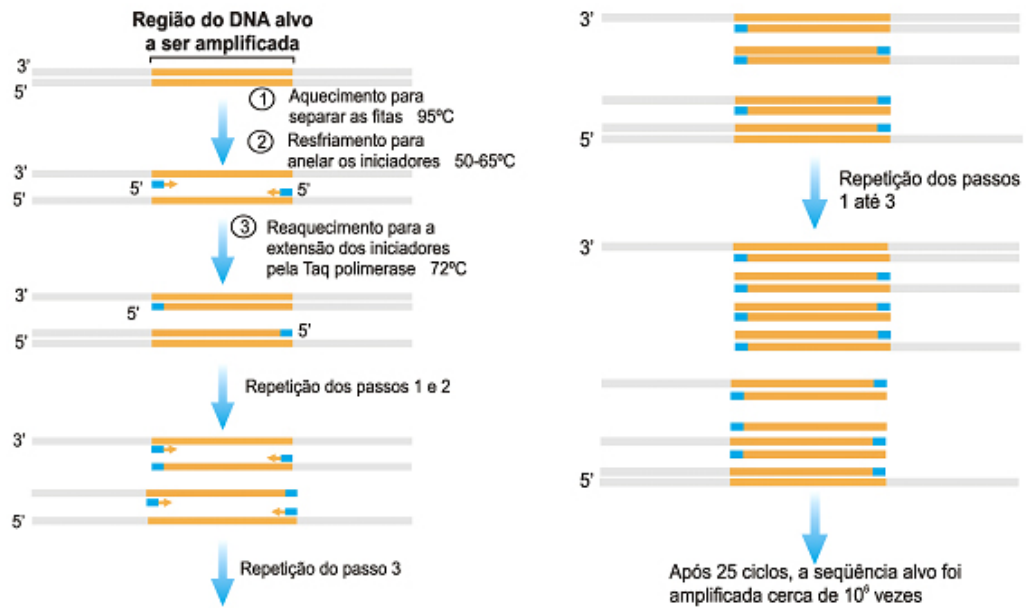


Figura 4 - Representação das etapas da PCR para amplificação de DNA (adaptado de Nelson, Cox (2000), p.1130).

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 (ANKLAM et al., 2002). Traços de DNA são suficientes para detecção de OGM em alimentos uma vez que o que mais importa na detecção é a qualidade, quantidade e a pureza do DNA extraído (TENGELE et al., 2001).

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, seqüenciamento do produto da PCR ou realização de uma *nested* PCR (SOMMA e QUERCI, 2004).

1.7.6 *Nested* PCR

A técnica denominada *nested* PCR pode ser usada para 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 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 5).

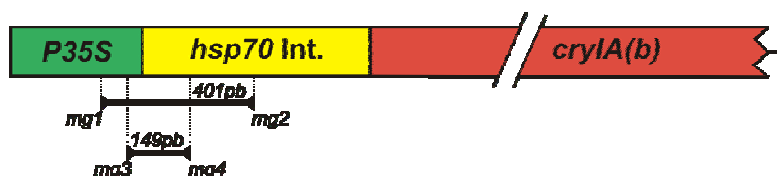


Figura 5 - Diagrama esquemático dos fragmentos de DNA recombinante do milho MON810 amplificados por *nested* PCR. Amplificação do fragmento de 401 pb com os iniciadores mg1/mg2 para detecção específica da junção entre o P35S e o intron 1 da proteína hsp70 do milho MON810 seguida por *nested* PCR com os iniciadores mg3/mg4 que amplificam parte do fragmento anterior, incluindo o P35S e o exon 1 da proteína (hsp 70), que resulta em um fragmento de 149 pb (adaptado de ZIMMERMANN et al., 1998).

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).

1.7.7 PCR multiplex

A PCR multiplex permite a detecção de várias linhagens transgênicas simultaneamente. Através da combinação de diversos pares de iniciadores no mesmo tubo de reação é possível 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., 2004). Diversos pesquisadores utilizaram PCR multiplex para detecção de milho GM (MATSUOKA et al., 2002; JAMES et al., 2003; GERMINI et al., 2004; ONISHI et al., 2005).

Huang e Pan (2004) utilizaram iniciadores específicos para detecção simultânea das linhagens de milho MON810 e NK603 e encontraram um limite de detecção de 0,5 %. Onishi et al. (2005) utilizaram PCR multiplex para detecção de oito linhagens de milho GM que incluíram Bt11, Event 176, 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 linhagem GM presente na amostra porque o resultado obtido pode ser interpretado de diferentes maneiras, tais como: a amostra contém uma linhagem GM específica; 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; 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).

1.7.8 PCR em Tempo Real

O método para quantificação de alimentos contendo OGM mais utilizado é a PCR em Tempo Real. Esse método permite monitorar a reação de PCR durante a sua ocorrência, em tempo real. Os resultados geralmente são expressos em percentual de material GM em relação ao material do organismo parental (LAJOLO; NUTTI, 2003). Isso 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. Entre os sistemas mais utilizados em PCR em tempo real destacam-se os corantes intercalantes (SYBR® Green) e as sondas de hibridização (TaqMan®, FRET, Scorpion™) (LIPP et al., 2005).

Alary et al. (2002) comprovaram a eficiência da sonda TaqMan para análise de grãos de soja RR e milho Event176 através da amplificação de um fragmento do promotor 35S e de genes endógenos. Hernandez et al. (2003) apresentaram um método para quantificação simultânea de diferentes produtos de amplificação específicos para a soja RR e para os milhos Event 176, Bt11, MON810 e GA21.

1.7.9 Iniciadores para PCR do milho

Diversos iniciadores para PCR podem ser utilizados na detecção de DNA do milho convencional e de DNA de milho GM. Fragmentos de genes codantes da zeína e da invertase, específicos do milho, são amplificados por PCR para confirmar a presença e a integridade do DNA do milho. Regiões comuns a diversas linhagens GM, como a do promotor P35S, a dos terminadores T-35S e T-NOS, e de genes como o *cryIA(b)*, podem ser amplificadas por PCR a fim de detectar a presença do milho GM (HUPFER et al., 1998; VOLLENHOFER et al., 1999; LIPP et al., 2001; JAMES et al., 2003; CARDARELLI et al., 2005; GREINER, KONIETZNY, VILLAVICENCIO, 2005).

A escolha dos iniciadores para detecção de fragmentos inseridos em grãos GM é baseada em informações sobre a construção genética e sobre as seqüências dos fragmentos de DNA inseridos na linhagem transgênica (MATSUOKA et al., 2002). O desenho de iniciadores pode ser feito a partir das seqüências de DNA conhecidas, como as depositadas no *GenBank* (banco de dados de seqüências de DNA disponível por meio eletrônico).

Destacam-se alguns alvos dos iniciadores utilizados na PCR do milho:

a) Invertase

A invertase é uma enzima que ocorre naturalmente no milho. A amplificação específica de um fragmento de 226 pb do gene que codifica a invertase do milho foi utilizada por diferentes pesquisadores para análise do DNA extraído de amostras de milho (HUPFER et al., 1998; JAMES et al., 2003; GREINER, KONIETZNY, VILLAVICENCIO, 2005). Outro trabalho propõe a amplificação de um fragmento de 122 pb do mesmo gene (VOLLENHOFER et al., 1999).

b) Zeína

Diversos pesquisadores utilizaram a amplificação específica do gene da delta-zeína do milho como controle da qualidade do DNA extraído. Matsuoka et al. (2002); Yamaguchi et al. (2003) e Cardarelli et al. (2005) utilizaram o par de iniciadores ZEO1-F/ZEO2-R para amplificação de um fragmento de 329 pb da zeína do milho. Höhne, Santisi, Meyer (2002) e Bordoni et al. (2005) utilizaram outros iniciadores para amplificação de um fragmento, respectivamente, de 84 pb e 139 pb da zeína do milho.

c) Promotor P35S

A amplificação do promotor 35S (P35S) do vírus do mosaico da couve-flor é freqüentemente utilizada como forma de detecção do milho GM. Diferentes iniciadores são utilizados para amplificação de diversos fragmentos do P35S que variam de 68 pb a 195 pb (LIPP et al., 2001; CARDARELLI et al., 2005; VOLLENHOFER et al., 1999; HÖHNE, SANTISI, MEYER, 2002; ALARY et al., 2002). Lipp et al. (1999) desenvolveram um estudo interlaboratorial e testaram a amplificação do P35S com quatro diferentes pares de iniciadores: 35S-af1/35S-ar1; HA-35S-118f/HA-35S-118r, 35S-1/35S-2 e 35S-cf3/35S-cr4. Este estudo comprovou que o par de iniciadores 35S-1/35S-2, que amplifica um fragmento de 195 pb, foi o menos eficiente para detecção do P35S. Já os pares de iniciadores 35S-cf3/35Scr4, que amplificam o fragmento de 123 pb, foram mais eficientes. Lipp et al. (2001) e

Cardarelli et al. (2005) utilizaram o mesmo par de iniciadores (35S-cf3/ 35S-cr4) para amplificar o P35S. Este par de iniciadores apresentou 98,1 % de eficiência na detecção de alimentos contendo milho GM, que incluíram polenta, biscoito de milho e fórmula infantil (LIPP et al., 2001).

d) *cryIA(b)*

Fragmentos de 147 pb a 211 pb presentes em linhagens GM podem ser amplificados com diferentes iniciadores *cry*, tais como o Cry01/Cry02, o Cry03/Cry04 e o CryIA 4-5/CryIA 4-3 (HUPFER et al., 1998; JANKIEWICZ, BROLL, ZAGON, 1999; GREINER, KONIETZNY, VILLAVICENCIO, 2005; JAMES et al., 2003; VOLLENHOFER et al., 1999). Contudo, existem algumas diferenças na seqüência de DNA para o gene *cryIA(b)* inserido nas linhagens de milho GM Event 176, Bt11, MON810 e MON802 com respeito ao uso de diferentes nucleotídeos conforme mostra a Figura 6 (MATSUOKA et al., 2002). Nas linhagens MON810 e MON802 a seqüência de DNA para o gene *cryIA(b)* é a mesma. Matsuoka et al. (2002) utilizaram dois pares de primers, *cryIA4-5'*/*cryIA3-3'* e *cryIA4-5'*/*cryIA4-3'*, pra amplificação do gene *cryIA(b)* e obtiveram fragmentos de 107 pb e 152 pb, respectivamente, para as quatro linhagens de milho analisadas (Figura 6).

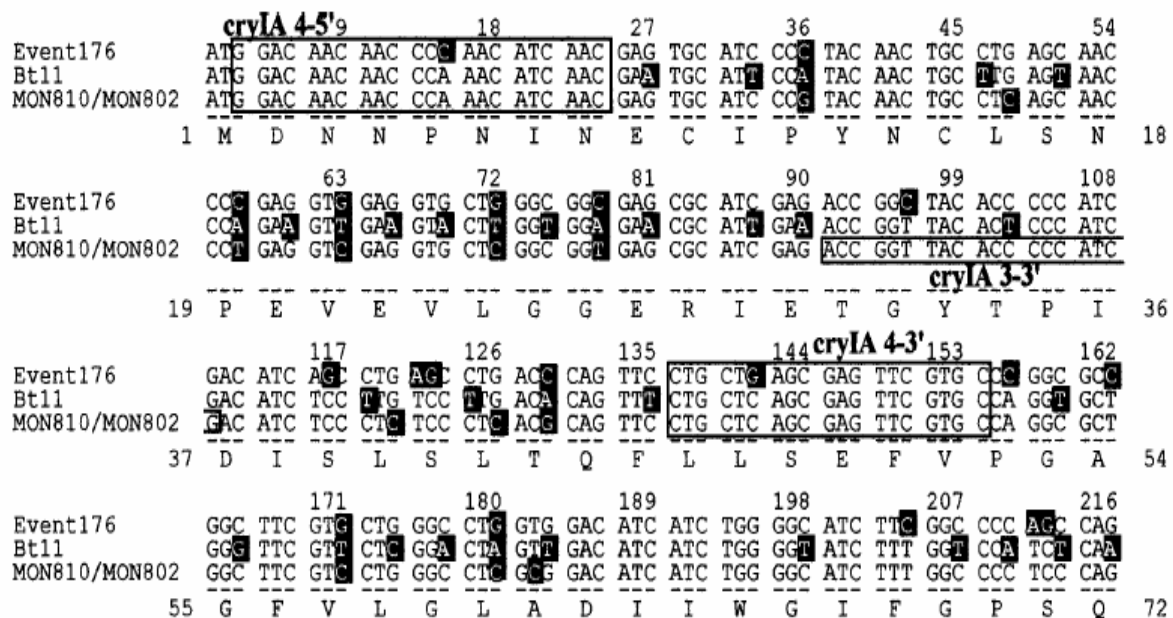


Figura 6 – Seqüência N-terminal de 216 pb e seqüência resultante de aminoácidos do gene *cryIA(b)* introduzido nas linhagens de milho GM Event 176, Bt11, MON810 e MON802, respectivamente. As diferenças nas seqüências do DNA recombinante dessas linhagens estão destacadas com o fundo preto. As seqüências de DNA para anelamento dos iniciadores na detecção do gene *cryIA(b)* estão limitadas com caixas de texto (MATSUOKA et al., 2002).

e) MON810

MON810 pode ser detectado por *nested* PCR (Figura 5). Os iniciadores mg1/mg2 são utilizados para detecção específica da junção entre o P35S e o intron 1 da proteína hsp70 do milho MON810 e produzem um fragmento de 401 pb. Os iniciadores mg3/mg4 amplificam parte do fragmento anterior incluindo o P35S e o exon 1 da proteína hsp 70. (ZIMMERMANN et al., 1998; CARDARELLI et al., 2005). Os elementos P35S, intron 1 e exon 1 da proteína hsp 70 estão presentes de forma combinada apenas na linhagem MON810 o que torna esses iniciadores altamente específicos para esta linhagem (ZIMMERMANN et al., 1998).

1.7.10 Material de Referência

A análise de alimentos contendo OGM requer material de referência específico para cada OGM. O uso de material de referência permite validar procedimentos analíticos e avaliar o desempenho de métodos de laboratório com precisão e segurança na comparação dos resultados com controles positivos e negativos certificados (PAN, 2002; LIPP et al., 2005).

Grãos, DNA recombinante, proteínas, materiais não processados e ingredientes-base são utilizados como material de referência geralmente na forma moída, pulverizada ou liofilizada (AHMED, 2002). São geralmente produzidos pelo Instituto de Materiais de Referência e Medida (IRMM). A Bélgica é um dos maiores fornecedores de material de referência certificado e aprovado (PAN, 2002; ANKLAM, 2002).

1.7.11 Amostragem

A amostragem correta evita resultados errôneos. Lipp et al. (2005) destacam que quando a PCR é utilizada para verificar a presença de material GM em grãos é necessário seguir os seguintes passos:

- 1) Escolha dos grãos para obter a amostra total;
- 2) Obtenção da amostra laboratorial a partir da amostra total;
- 3) Obtenção da amostra para teste a partir da amostra laboratorial;
- 4) Trituração da amostra de teste para extração do DNA;
- 5) Diluição da solução de DNA extraído.

A amostragem para detecção de OGM por PCR depende das limitações da técnica empregada e do equipamento usado. Uma amostragem representativa requer conhecimento

das características do tamanho de partícula da amostra analisada, o tamanho do genoma das espécies em questão, o limite de detecção ou a taxa de quantificação da técnica analítica utilizada (LIPP et al., 2005). Grandes lotes de grãos não são homogêneos com respeito à distribuição de pequenas quantidades de grãos GM e isso afeta diretamente o método de detecção (MACARTHUR et al., 2007).

O Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) e a Comissão do *Codex Alimentarius* estabeleceram protocolos de amostragem para grãos GM. Contudo, para amostras complexas ou alimentos processados, a estratégia mais favorável de amostragem é o equilíbrio entre sensibilidade, custo e confiança (PAN, 2002).

CAPÍTULO 2

**Detecção do promotor CaMV 35S e do gene *cryIA* (b) em alimentos
derivados do milho**

2 DETECÇÃO DO PROMOTOR CAMV 35S E DO GENE *cryIA* (b)

EM ALIMENTOS DERIVADOS DO MILHO

Artigo submetido à revista Acta Alimentaria

Andréia Zilio Dinon , Ana Carolina Maisonnave Arisi *

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias

Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346

880034-001 Florianópolis-SC BRASIL

Resumo

O método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi empregado para detecção de milho geneticamente modificado (GM) em 64 amostras de alimentos comercializados no Brasil (farinha de milho, fubá, biju e flocos de milho pré-cozido para o preparo de polenta) e para duas amostras de alimentos comercializados na Argentina (farinha de milho e polenta). Realizou-se a detecção do promotor 35S (P35S) e do gene *cryIA*(b). O DNA das amostras foi extraído utilizando o método do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e a presença de DNA amplificável foi avaliada pela amplificação de fragmentos dos genes endógenos da invertase e da zeína do milho. Todas as amostras foram positivas para amplificação do gene da zeína, entretanto a amplificação do gene da invertase não apresentou reprodutibilidade para maioria das amostras. No total das 64 amostras de alimentos brasileiros e derivados de milho analisadas, uma amostra foi positiva para o P35S e para o gene *cryIA*(b) e 18 amostras foram positivas para o gene *cryIA*(b). As duas amostras de alimentos argentinos foram positivas para presença do P35S e do gene *cryIA*(b) indicando a presença de milho GM nestas amostras. A presença do gene *cryIA*(b) concomitante a ausência do promotor P35S em 18 amostras foi provavelmente devido ao uso do *Bacillus thuringiensis* como inseticida biológico.

Palavras-chave: PCR, detecção de OGM, milho GM.

2.1 Introdução

Bacillus thuringiensis (Bt) é um microrganismo encontrado no solo em muitas regiões do Brasil. Este bacilo é utilizado como inseticida biológico através da pulverização dos esporos na lavoura, prática esta amplamente utilizada na produção orgânica (VALICENTE et al., 2000; PRAÇA et al., 2004). A fim de conferir resistência contra insetos, genes de Bt já são usados em diversas espécies de plantas como algodão, milho e arroz (JOUANIN et al., 1998).

A construção de plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a insetos utiliza diferentes genes de Bt que codificam proteínas como CryIA(b), CryIB e CryID (VALICENTE et al., 2000). O milho resistente a insetos é resistente contra a broca europeia do milho (ECB), devido a inserção de uma seqüência codificadora da endotoxina sintética CryIAb (ZIMMERMAN et al., 1998). De acordo com Margarit et al. (2006), as linhagens de milho GM que contém diferentes seqüências do gene sintético *cryIA(b)*, previamente autorizados para comércio na Argentina e na Europa, foram o Event 176 da Novartis, o MON810 da Monsanto e o Bt11 da Syngenta. O gene *cryIA(b)* presente nas linhagens de milho GM MON810 e Bt11 está sob o controle de um promotor constitutivo forte, o promotor 35S ou P35S (MATSUOKA et al., 2002).

Métodos de detecção para OGM em alimentos geralmente utilizam a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do novo DNA introduzido na planta GM (ANKLAM et al., 2002; HOLST-JENSEN et al., 2003; TAVERNIERS, VAN BOCKSTAELE, DE LOOSE, 2004). Existem dois tipos distintos de PCR que são o sistema específico e o sistema de triagem. O sistema específico detecta um DNA recombinante particular (BROD, ARISI, 2007), enquanto o de triagem detecta elementos comumente utilizados na engenharia genética como o promotor ou o terminador. OGMs frequentemente contém o promotor CaMV 35S (P35S), o terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, e outros elementos inseridos como genes de resistência e marcadores (BRODMANN, ILG, BERTHOUD, HERMANN, 2002; UJHELYI, JÁNOSI, GELENCSE, 2007). Estes elementos podem ser detectados para confirmar a presença de OGM em alimentos. Para este objetivo, um método de triagem pode ser usado a fim de detectar a presença ou ausência de OGM. A PCR é o método analítico mais amplamente utilizado na detecção de OGM devido a sua alta sensibilidade e especificidade na amplificação do DNA (MIRAGLIA et al., 2004; MATSUOKA et al., 2002).

O controle analítico para detecção de OGM em diversos alimentos é necessário para verificar a conformidade com os requerimentos de rotulagem (BRASIL, 2003). O milho GM ainda não foi aprovado para comercialização no Brasil. Entretanto, as linhagens de milho GM Bt 11, Event 176 e MON810 foram encontradas em produtos comercializados no Brasil em 2000 e 2001 (GREINER, KONIETZNY, VILLAVICENCIO, 2005).

Este trabalho tem como objetivo a detecção de OGM através da PCR como sistema de triagem, para o P35S e o gene *cryIA(b)*, na análise de diferentes alimentos derivados de milho (farinha, fubá, biju e polenta) comercializados no Brasil e para duas amostras (farinha e polenta) comercializadas na Argentina.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Amostragem

Foram analisadas 64 amostras de alimentos brasileiros, sendo 14 de farinha de milho (codificadas como F1 até F15), 21 de fubá (A1 até A23), 10 de biju ou farinha de milho flocada, (B1 até B10) e 19 de flocos de milho pré-cozido para o preparo de polenta (P1 até P19) que foram obtidas em supermercados de Florianópolis, Santa Catarina, entre os anos de 2005 e 2006. Uma amostra de farinha (H1) e uma amostra de flocos de milho pré-cozido para o preparo de polenta (H2) foram adquiridas no comércio da cidade de Bernardo de Irigoyen, Misiones, Argentina. Controles positivos de grãos de milho moído contendo padrões de referência 0,1 %, 1,0 % e 5,0 % de milho GM MON810 foram adquiridos do *European Reference Material (ERM, Geel, Bélgica)*. Controles negativos foram obtidos de grãos de milho não GM cedidos gentilmente por produtores brasileiros do Estado de Santa Catarina.

2.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em duplicata a partir de 0,1 g das amostras trituradas e utilizou o método CTAB descrito por Lipp et al. (1999) e adaptado conforme Brod et al. (2007). A concentração e a pureza do DNA extraído foi estimada através da absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetros Hitachi U1800 e U2010 (Hitachi High-Technologies, Tóquio, Japão) conforme Somma (2004).

2.2.3 Iniciadores

Os pares de iniciadores de PCR utilizados para amplificação do gene da invertase (IVR1-F/IVR1-R), do gene da zeína (ZEO1-F/ZEO2-R), do gene *cryIA(b)* (CryIA-F/CryIA-R) e do promotor 35S (p35S-cf3/p35S-cr4) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para detecção por PCR dos genes da zeína e da invertase do milho, do promotor P35S e do gene *cryIA* (b).

Iniciador	Seqüência (5' a 3')	Tamanho Amplicon	Referências
ZEO1 – F ZEO2 - R	TGCTTGCATTGTTTCGCTCTCCTAG GTCGCAGTGACATTGTGGCAT	329 pb	MATSUOKA et al., 2000 CARDARELLI et al., 2005
IVR1-F IVR1-R	CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C	226 pb	HUPFER et al., 1998; JAMES et al., 2003; GREINER et al., 2005
p35S-cf3 p35S-cr4	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG TCCTCTCCAAATGAAATGAACTCC	123 pb	LIPP et al., 2001
CryIA - F CryIA - R	GGACAACAACCCAAACATCAAC GCACGAACTCGCTGAGCAG	152 pb	MATSUOKA et al., 2002*

* Baseado na seqüência do gene *cryIA(b)* de MON810 publicado em MATSUOKA et al., 2002.

Iniciadores da zeína e da invertase foram usados como controle interno para a amplificação de genes endógenos do milho. Os iniciadores de PCR foram sintetizados pela Invitrogen™ (Carlsbad, Califórnia, EUA).

2.2.4 Condições da PCR

A PCR convencional foi realizada em termociclador Minicycler™ (MJ Research, Inc. Watertown, MA, EUA) em um volume final de 25 µL, contendo 50 ng/reacção de DNA molde (25 ng/reacção de DNA molde para detecção do gene *cryIA(b)*), 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen™), 1X tampão de PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 160 µM dNTP (200 µM dNTP para detecção da zeína) e para os iniciadores: 0,5 µM ZEO1/ZEO2, 1 µM IVR1-F/IVR1-R, 0,5 µM CryIA-F/CryIA-R e 0,24µM p35Scf3/p35Scr4. Na detecção do P35S, PCR *master mix* da PROMEGA® também foi utilizado.

As condições de temperatura de PCR foram: para os iniciadores IVR1-F/IVR1-R – desnaturação a 95°C por 10 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30s, 64°C por 30s e 72°C por 30s e extensão final por 7 min a 72°C (GREINER, KONIETZNY,

VILLAVICENCIO, 2005); para os iniciadores ZEO1/ZEO2: desnaturação a 95°C por 3 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min (CARDARELLI et al., 2005); para os iniciadores CryIA-F/CryIA-R: desnaturação a 95°C por 10 min, seguida por 50 ciclos a 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min (adaptado de MATSUOKA et al., 2002); para os iniciadores p35S-cr3/p35Scf4: desnaturação a 95°C por 5 min, seguida por 60 ciclos de 95°C por 45s, 60°C por 50s e 72°C por 50s e extensão final a 72°C por 7 min (adaptado de LIPP et al., 2001).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose conforme Ausubel et al. (1989) nas seguintes concentrações: 1,5 % (gene da invertase); 2,0 % (gene da zeína) e 2,5 % (gene *cryIA* (b) e P35S) em tampão Tris-borato-EDTA. O gel de agarose foi corado com brometo de etídeo e submetido à eletroforese a 80 V e 400 mA por 30 minutos (gene da zeína) e 50 minutos (gene da invertase, P35S e gene *cryIA*(b)). A visualização foi realizada em transiluminador UV a 312 nm e as imagens foram fotografadas com câmera digital Canon Powershot A70 (Canon Inc., Tóquio, Japão).

Amostras que apresentaram o amplicon esperado apenas em uma extração de DNA foram consideradas negativas. Uma reação utilizando água ao invés do DNA extraído foi realizada com cada mistura de reativos utilizada na PCR e, para cada análise de amostras, uma série de controles positivos e negativos foi avaliada a fim de assegurar a precisão dos resultados (HÜBNER, STUDER, LUTHY, 1999).

2.3 Resultados e Discussão

O DNA extraído em duplicata pelo método CTAB, resultou em alto rendimento para todas as amostras de grãos de milho e para os materiais de referência, mas baixos rendimentos para a maioria das amostras processadas, o que foi observado pelas medidas de absorbância a 260 e 280 nm, bem como pela relação $A_{260/280}$ com valores próximos a 1,8 (SOMMA, 2004). A presença de DNA amplificável foi verificada por PCR pela detecção de dois genes específicos do milho, gene da invertase e gene da zeína do milho.

2.3.1 Detecção do gene da invertase

No total de 27 amostras analisadas para amplificação do gene da invertase (7 farinha de milho, 8 fubá, 4 biju e 8 polenta), 24 amostras amplificaram um fragmento de 216 pb do gene da invertase do milho. Entretanto 3 amostras de farinha de milho e 1 controle de grão

de milho não apresentaram nenhuma amplificação. Na Figura 7a observa-se um sinal de amplificação muito fraco para a amostra de grão de milho (canaleta 3) e também para amostra de farinha de milho F1 (canaleta 6).

O aumento no número de ciclos da PCR para 50 ciclos não melhorou a amplificação. Também foram realizadas diluições seriadas para amostras de DNA de milho (50; 25; 5,0; 0,5; 0,05 e 0,005 ng/reacção) e estas não apresentaram nenhuma amplificação (Figura 7b). A amplificação do gene da invertase com os iniciadores IVR1-F/IVR1-R mostraram baixa reprodutibilidade nas condições utilizadas neste trabalho (Figura 7a-b).

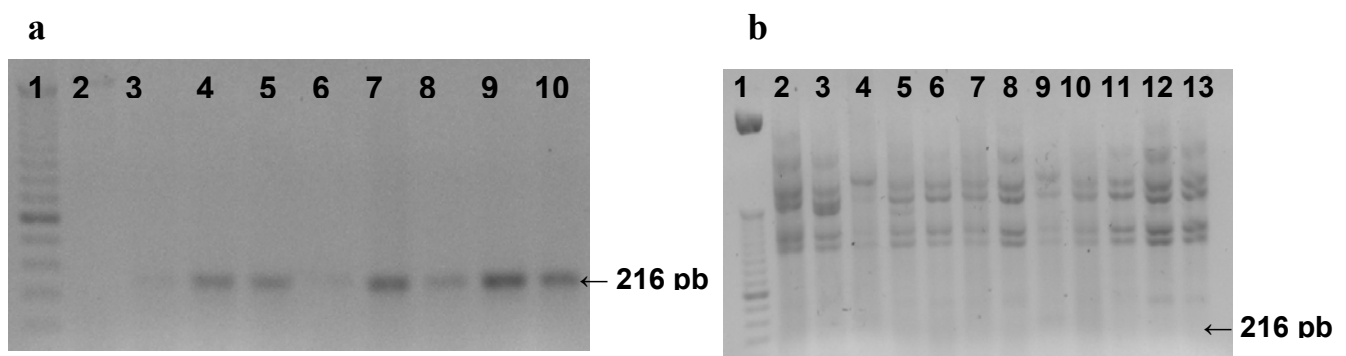


Figura 7- Detecção de DNA amplificável de milho por PCR com os iniciadores IVR1-F/IVR1-R.

(a) Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (DNA de extrato de soja); canaleta 3: controle positivo (DNA de grão de milho); canaletas 4-5: amostras de polenta (P1 e P2, respectivamente); canaletas 6-9: amostras de farinha de milho (F1, F2, F3 e F4, respectivamente); canaleta 10: DNA de grão de milho (1B); (10 μ L do produto da PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

(b) Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle negativo (DNA de extrato de soja); canaleta 4: controle positivo (DNA de grão de milho 50 ng/reacção); canaleta 5: DNA de grão de milho 5,0 ng/reacção; canaleta 6: DNA de grão de milho 0,5 ng/reacção; canaleta 7: DNA de grão de milho 0,05 ng/reacção; canaleta 8: DNA de grão de milho 0,005 ng/reacção; canaleta 9: amostra de polenta 50 ng DNA/reacção; canaleta 10: amostra de polenta 5,0 ng DNA/reacção; canaleta 11: amostra de polenta 0,5 ng DNA/reacção; canaleta 12: amostra de polenta 0,05 ng DNA/reacção; canaleta 13: amostra de polenta 0,005 ng DNA/reacção (10 μ L do produto da PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

Após a repetição da amplificação, a ausência do produto de PCR esperado foi observada para muitas amostras em diferentes condições de PCR. Portanto, a detecção do DNA de milho pela amplificação do gene da invertase com os iniciadores IVR1-F/IVR1-R foi substituída pela detecção de DNA de milho pela amplificação do gene da zeína com os iniciadores ZEO1/ZEO2.

2.3.2 Detecção do gene da zeína

A amplificação do fragmento do gene da zeína foi observada para todas as 64 amostras analisadas. Isso demonstrou que foi extraída quantidade suficiente de DNA para as amostras de alimentos e o DNA apresentou qualidade para ser amplificado. A eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR apresentou o fragmento de 329 pb do gene da zeína para diferentes amostras de farinha de milho, fubá, biju e polenta (Figura 8).

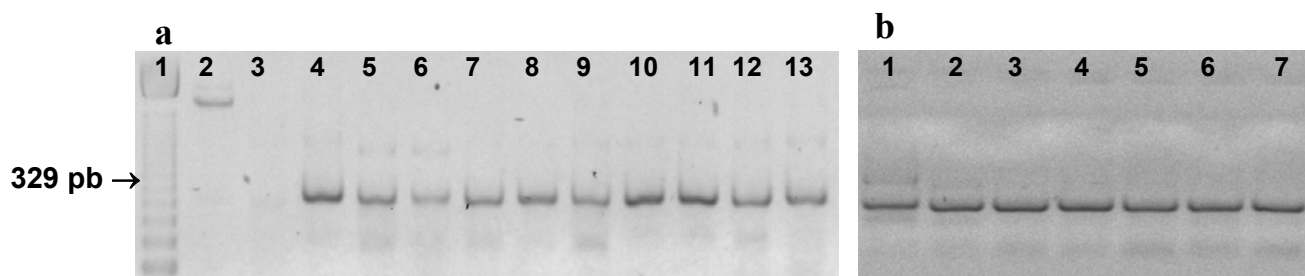


Figura 8- Detecção de DNA amplificável de milho por PCR com iniciadores ZEO1/ZEO2.

(a) Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50 bp (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle negativo (DNA de extrato de soja); canaleta 4: controle positivo (DNA de grão de milho); canaletas 5-6: amostras de biju (B8 e B9, respectivamente); canaletas 7-11: amostras de polenta (P16, P17, P18, P19 e P20, respectivamente); canaletas 12-13: amostras de fubá (A17 e A18, respectivamente); (10 μ L do produto da PCR + 2 μ L do tampão de carga por canaleta).

(b) Canaleta 1: controle positivo (DNA de grão de milho); canaleta 2: amostra de biju (B10); canaletas 3-5: amostras de farinha de milho (F12, F13 e F14, respectivamente); canaleta 6: amostra de polenta (P20); canaleta 7: amostra de fubá (A20); (10 μ L do produto da PCR + 2 μ L do tampão de carga por canaleta).

Nenhuma amplificação foi observada para água e para o controle negativo como representado nas canaletas 2 e 3 da Figura 8a. Estes resultados confirmaram a ausência de contaminação na PCR e no processo de extração do DNA das amostras de milho.

2.3.3 Detecção do gene *cryIA(b)*

A fim de detectar a presença do gene *cryIA(b)* nas amostras de alimentos, foram utilizados os iniciadores descritos por Matsuoka et al. (2002) para amplificação de um fragmento de 152 pb presente no milho GM Bt11 e no MON810. A seqüência do gene *cryIA(b)* presente no Event 176 apresenta um nucleotídeo diferente nas regiões de anelamento de ambos os iniciadores, senso e anti-senso (MATSUOKA et al., 2002). As condições de PCR foram ajustadas utilizando materiais de referência MON810 e modificando-se as condições originais descritas por Matsuoka et al. (2002) em relação ao número de ciclos da PCR (de 45 para 50 ciclos), o tempo de anelamento (de 2 minutos para

1 minuto), a temperatura de anelamento (de 55°C para 60°C) e a concentração de DNA alvo (de 50 ng/reação para 25 ng/reação).

Os resultados obtidos para as amostras submetidas a PCR utilizando os iniciadores *CryIA-F/CryIA-R* permitiram observar a presença do fragmento amplificado de 152 pb do gene *cryIA(b)* em 19 amostras de alimentos brasileiros, incluindo 4 amostras de farinha de milho, 6 de fubá, 7 de biju e 2 de polenta e as duas amostras de alimentos argentinos (H1 e H2) foram positivas para este fragmento. Diferentes perfis de amplificação inespecífica foram observados para a mesma amostra quando foi comparada a extração de DNA em duplicata, enquanto o amplicon específico de 152 pb foi claramente distinto de outras bandas e esteve presente em todas as duplicatas de extração do DNA das 19 amostras positivas. Algumas amostras de fubá (canaletas 6-16a), de biju (canaletas 17-20a), de farinha de milho (canaletas 8-9b) e de polenta (canaletas 10-11b) estão representadas na Figura 9a-b.

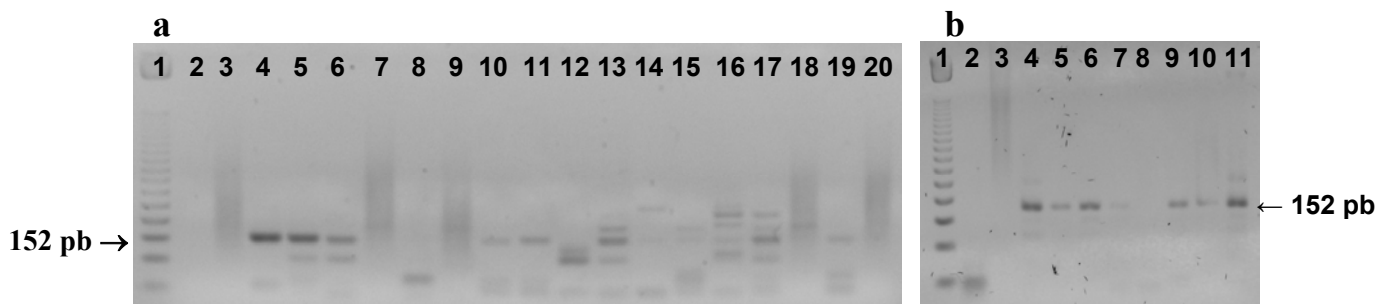


Figura 9 - Detecção do fragmento de 152 pb com os iniciadores *CryIA-F/CryIA-R* através da PCR.

(a) Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50 pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle negativo (DNA de grão de milho); canaleta 4: milho GM MON810 0,1 %; canaleta 5: milho GM MON810 1,0 %; canaletas 6-7: amostras de fubá (A12 em duplicata); canaletas 8-9: amostras de fubá (A17 em duplicata); canaleta 10: amostra de fubá (A20); canaletas 11-12: amostras de fubá (A21 em duplicata); canaletas 13-14: amostras de fubá (A22 em duplicata); canaletas 15-16: amostras de fubá (A23 em duplicata); canaletas 17-18: amostra de biju (B6 em duplicata); canaletas 19-20: amostra de biju (B7 em duplicata); (25 µL do produto da PCR + 2 µL do tampão de carga por canaleta).

(b) Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50 pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle negativo (DNA de soja); canaleta 4: controle negativo (DNA de grão de milho); canaleta 5: milho GM MON810 0,1 %; canaleta 6: milho GM MON810 1,0 %; canaleta 7: milho GM MON810 5,0 %; canaletas 8-9: amostras de farinha de milho (F3 e F8, respectivamente); canaletas 10-11: amostras de polenta (P7 e P9, respectivamente); (10 µL do produto da PCR + 2 µL do tampão de carga por canaleta).

As outras 45 amostras brasileiras analisadas e os controles negativos não apresentaram o amplicon correspondente ao gene *cryIA(b)*. Todos os padrões de referência (0,1 %, 1,0 % e 5,0 % milho GM MON810) apresentaram um sinal positivo (Figura 9a-b).

2.3.4 Detecção do P35S

Um total de 26 amostras de alimentos foram analisadas para presença do P35S (7 amostras de farinha de milho, 6 de fubá, 7 de biju e 6 de polenta), e estas incluíram as 19 amostras positivas para presença do gene *cryIA(b)*.

Apenas uma amostra brasileira de fubá (A23, canaleta 9 da Figura 10) e as duas amostras de alimentos argentinos (H1 e H2) apresentaram resultados positivos na detecção do P35S.

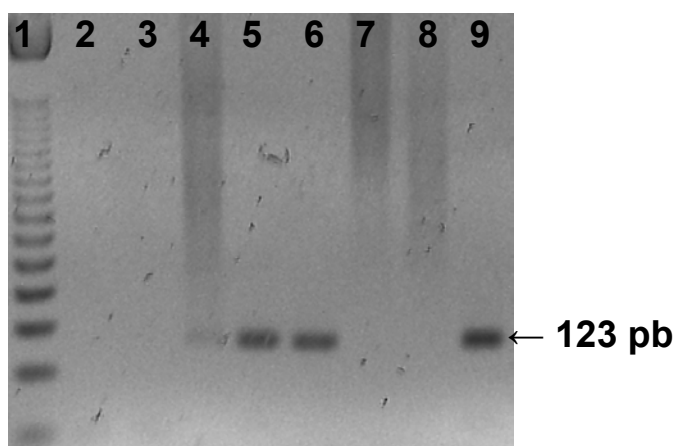


Figura 10 - Detecção do fragmento de 123 pb com os iniciadores p35Scf3/p35Scr4 através da PCR.

Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle negativo (DNA de grão de milho não GM); canaleta 4: controle positivo (milho GM MON810 1 %); canaleta 5: milho GM MON810 1 % diluído a partir do milho GM MON810 5 %; canaleta 6: milho GM MON810 5 %; canaleta 7: amostra de biju (B11); canaleta 8: amostra de polenta (P22); canaleta 9: amostra de fubá (A23); (10 μ L do produto da PCR + 2 μ L do tampão de carga por canaleta).

O amplicon esperado de 123 pb foi observado nos padrões de referência MON810 1% e 5 % (Figura 10). Nenhum sinal positivo foi observado para os controles negativos e para o padrão MON810 0,1 %. O limite de detecção de 0,1% foi observado pela detecção do P35S com os iniciadores p35Scf3/p35Scr4 em estudo interlaboratorial conforme as condições originais descritas por LIPP et al. (1999).

Em nosso trabalho, ajustes na PCR para detecção do P35S alteraram as condições originais da PCR descritas por LIPP et al. (2001) em relação ao número de ciclos (de 50 para 60 ciclos), à temperatura de anelamento (de 62°C para 60°C, 58°C, 56°C, 55°C, 54°C e 52°C), ao tempo de anelamento (de 45 segundos para 50 e 60 segundos), as concentrações de MgCl₂ (de 1,5mM para 2,0 e 2,5 mM), de iniciadores (de 0,6 μ M para 0,24 e 1,0 μ M) e de DNA alvo (de 50 ng/reação para 25 ng/reação e retorno a 50 ng/reação). Nas diversas condições testadas, observou-se ausência de amplificação e também amplificações

inespecíficas para maioria das amostras. Contudo, as condições estabelecidas para os iniciadores p35Scf3/p35Scr4 descritas na seção de material e métodos apresentaram os melhores resultados de especificidade e reprodutibilidade na detecção dos padrões de milho GM MON810 1 % e 5% (Figura 10).

2.3.5 Detecção do milho GM

Todos os resultados obtidos para detecção do milho GM utilizando diferentes iniciadores estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Detecção do gene *cryIA(b)* e do promotor P35S em produtos comerciais.

Amostras	Produtos comerciais (codificação)	Nº de amostras analisadas	Amostras positivas para <i>cryIA(b)</i>	Amostras positivas para P35S
Brasil	Farinha de milho (F)	14	4	nd
	Fubá (A)	21	6	1
	Biju (B)	10	7	nd
	Polenta (P)	20	2	nd
Argentina	Farinha de milho (H1)	1	1	1
	Polenta (H2)	1	1	1

n.d. = não detectado.

No total de 21 amostras de fubá, 5 amostras (A4, A9, A13, A19 e A22) foram positivas para a presença do gene *cryIA(b)* e uma amostra (A23) foi positiva para presença de P35S e do gene *cryIA(b)*. Nas 14 amostras de farinha analisadas, 4 (F2, F3, F5 e F8) apresentaram um sinal positivo para o gene *cryIA(b)*. No total de 10 amostras de biju e 19 de polenta, 7 amostras de biju (B1, B2, B3, B4, B7, B8 e B9) e 2 de polenta (P4 e P11) foram positivas para o gene *cryIA(b)*. As duas amostras de alimentos argentinos (H1 e H2) foram positivas para presença do gene *cryIA(b)* e do P35S.

A análise das amostras através da extração do DNA em duplicata e a repetição da PCR foram passos importantes para confirmar os resultados obtidos. Contudo, algumas amostras de DNA extraídas em duplicata apresentaram resultado positivo e resultado negativo para a detecção do gene *cryIA(b)* para a mesma amostra. Foi necessário realizar uma terceira extração para estas amostras e uma nova PCR a fim de comprovar a presença ou ausência do gene *cryIA(b)*.

O fato de que todas as amostras derivadas de milho revelaram o amplicon esperado de 329 pb com os iniciadores ZEO1/ZEO2 demonstra que todas as amostras continham

DNA amplificável de milho. Isso também comprova que a ausência do amplicon esperado usando outros iniciadores não foi devido à presença de inibidores da PCR (ZIMMERMANN et al., 1998).

A detecção de material derivado de milho GM em alimentos comercializados no Brasil foi realizada por Greiner, Konietzny, Villavicencio (2005) e Cardarelli et al. (2005). Greiner, Konietzny, Villavicencio (2005) analisaram 100 alimentos contendo milho comercializados no Brasil entre 2000 e 2001. O milho GM foi detectado em 3 e em 6 amostras no total de 18 amostras de farinha de milho e 18 amostras de polenta, respectivamente. A presença de Bt11, Bt176 e MON810 foi detectada por PCR específica das amostras positivas para milho GM. Cardarelli et al. (2005) analisaram 89 alimentos contendo soja e milho, 25 foram positivos para presença do gene da zeína, 20 foram positivos para amplificação com os iniciadores p35Scf3/p35Scr4 e nenhuma destas amostras foi positiva para o milho GM MON810 nem para o milho GM Event176.

Observa-se que Greiner, Konietzny, Villavicencio (2005) utilizaram o Kit Wizard[®] para extração do DNA e a maioria das amostras analisadas e positivas para o milho GM (farinha de milho, polenta, *tortilla chips*) continham milho como ingrediente principal. As amostras deste estudo foram adquiridas antes da publicação do decreto brasileiro nº 4680 (BRASIL, 2003). Já o trabalho desenvolvido por Cardarelli et al. (2005), utilizou o método CTAB para extração do DNA. Muitas amostras analisadas que continham milho (sopa desidratada, salsicha, ração animal) são amostras de alimentos altamente processados, em matrizes complexas que não possuem o milho como ingrediente principal. Contudo, os resultados encontrados por Cardarelli et al. (2005) demonstraram o cumprimento ao decreto nº 4680 (BRASIL, 2003) em relação aos alimentos analisados para presença de milho GM.

2.4 Conclusão

A extração e purificação do DNA de farinha de milho, fubá, biju e polenta foi possível através do método CTAB nas condições utilizadas. Os métodos de triagem são inespecíficos, mas podem ser usados como primeiro passo na fiscalização da presença ou ausência do alimento GM. Todas amostras de alimentos derivados do milho foram positivas para o gene da zeína o que comprovou a extração de DNA amplificável. No total de 64 amostras de alimentos brasileiros à base de milho analisadas, 19 amostras foram positivas para o gene *cryIA(b)* e destas apenas uma foi também positiva para o P35S. O grande número de amostras positivas apenas para o gene *cryIA(b)* e não para o P35S pode ser

devido a presença do milho GM Event176 que possui dois cassetes de expressão do gene *cryIA(b)* sob o controle de promotores diferentes ao P35S. Também é possível o uso de bioinseticidas derivados do *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas destas amostras ainda na lavoura que deixam resíduos do gene *cryIA(b)* nos grãos de milho. Assim, a detecção do gene *cryIA(b)* de forma isolada nas amostras de alimentos brasileiros não caracteriza o evento transgênico, mas sugere sua possível presença. As amostras de alimentos argentinos analisadas foram positivas para o gene *cryIA(b)* e para o P35S o que comprova a presença de milho transgênico em amostras comercializadas na Argentina. Este é o primeiro artigo com dados de detecção de milho GM no Brasil publicado após o Decreto nº 4680 que especifica a rotulagem de alimentos contendo OGM.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq processo 476598/ 2003-6, e da Fundação de Amparo e Pesquisa de Santa Catarina, FAPESC, Brasil. AZD foi bolsista CAPES, Ministério da Educação, Brasil.

2.5 Referências

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 Technology**, v. 214, p.3-26, 2002.

AUSUBEL, F.M.; R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.E. MOORE, J.A. SMITH, J.G. SEIDMAN, K. STRUHL. **Current Protocols in Molecular Biology**, Wiley, New York, USA, p.221-222, 1989.

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

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**, v.40, p.748-751, 2007.

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**, v.87, p.1980-1984, 2007.

BRODMANN, P.D.; ILG, E.C.; BERTHOUD, H.; HERRMANN, A. Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. **Journal of AOAC International**, v.85, p.646-653, 2002.

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**, v.16, p.859-866, 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-methods. **Food Control**, v.16, p.753-759, 2005.

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

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

JOUANIN, L., BONADE-BOTTINO, M., GIRARD, C., MORROT, G., GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v.131, p.1-11, 1998.

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, n.4, p.923-928, 1999.

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

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.

MATSUOKA, T.; KAWASHIMA, Y.; AKIYAMA, H.; MIURA, H.; GODA, Y.; KUSAKABE, Y.; ISSHIKI, K.; TOYODA, M.; HINO, A. A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. **Journal of Food Hygienic Society of Japan**, v.50, p.137-143, 2000.

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.

MIRAGLIA, M.; BERDAL, K.G.; BRERA, C.; CORBISIER, P.; HOLST-JENSEN, A.; KOK, E.J.; MARVIN, H.J.P.; SCHIMMEL, H.; RENTSCH, J.; VAN RIE, J.P.P.F.; ZAGON,

J. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1157–1180, 2004.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C.M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.1, p.11-16, 2004.

SOMMA, M. Extraction and purification of DNA. In: The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. Session 4. **Joint Research Centre**, 2004. Disponível em: <<http://gmotraining.jrc.it/docs/session%2005.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2005.

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.

UJHELYI, G., JÁNOSI, A., GELENCSEÉR, E. Effects of different meat processing techniques on the detection of GM soy from model meat samples. **Acta Alimentaria**, v.36, p.39-48, 2007.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R.; VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PAIVA, E. Identificação através de PCR dos genes *CryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais Sociedade Entomologia do Brasil**, v.29, n.1, p.147-153, 2000.

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.

CAPÍTULO 3

Monitoramento da presença do milho geneticamente modificado MON810 em alimentos derivados de milho

3 MONITORAMENTO DA PRESENÇA DO MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO MON810 EM ALIMENTOS DERIVADOS DE MILHO

Artigo submetido a Journal of the Science of Food and Agriculture

Andréia Zilio Dinon , Jaqueline Elis de Melo, Ana Carolina Maisonnave Arisi *
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346
880034-001 Florianópolis-SC BRAZIL

*Autor para correspondência: +55 48 37 21 99 43

E-mail arisi@cca.ufsc.br

Resumo

Regulamentos para o uso e para a rotulagem de produtos geneticamente modificados (GM) e ingredientes derivados foram implementados no Brasil. O método *nested* PCR foi utilizado para monitorar a presença de milho GM MON810 em produtos derivados do milho (farinha de milho, fubá, biju e polenta) comercializados no Brasil e para duas amostras (farinha de milho e polenta) comercializadas na Argentina. A sensibilidade da *nested* PCR para detecção de MON810 foi 0,1 %. No total das 81 amostras de alimentos brasileiros analisadas, nenhuma foi positiva para presença de MON810. Nas amostras de alimentos argentinos foi detectada a presença de MON810. Os resultados mostraram ausência de milho GM MON810 em produtos adquiridos no comércio no Brasil entre os anos de 2005 e 2007.

Palavras-chave: produtos de milho, reação em cadeia da polimerase (PCR), organismos geneticamente modificados (OGM), análise de DNA.

3.1 Introdução

Constituinte de alimentos, o milho é a segunda planta geneticamente modificada (GM) mais cultivada no mundo. Em 2006 o plantio de milho ocupou 25 % da área total destinada ao cultivo de plantas GM (JAMES, 2006). No decorrer da comercialização de alimentos derivados de organismos geneticamente modificados (OGMs) surge uma discussão intensiva sobre sua detecção e rotulagem.

Conforme a legislação brasileira, lei n. 4680, de 24 de abril de 2003, a rotulagem específica é necessária para alimentos e ingredientes alimentares que contenham um limite de 1 % de OGM (BRASIL, 2003). O milho GM ainda não foi aprovado para a comercialização no Brasil, porém, os milhos GM Bt11, Event176 e MON810 foram encontrados em produtos comercializados no Brasil em 2000 e 2001 (GREINER, KONIETZNY, VILLAVICENCIO, 2005). Talvez este fato seja devido à amostragem deste estudo ter sido realizada antes da legislação brasileira sobre a fiscalização e liberação de alimentos GM que entrou em vigor em 2003 (BRASIL, 2003). De acordo com Margarit et al. (2006), as linhagens de milho GM contendo diferentes seqüências do gene sintético *cryIA(b)* autorizadas para o comércio na Argentina e na Europa foram as linhagens Event 176 da Novartis, MON810 da Monsanto e Bt11 da Syngenta. O gene *cryIA(b)* presente na linhagem de milho GM MON810 está sob o controle de um forte promotor constitutivo, promotor P35S, com região “*enhancer*” duplicada (MATSUOKA et al., 2002) resultando na sua alta expressão no milho (MARGARIT et al., 2006).

O monitoramento de OGMs em diversos alimentos é necessário a fim de verificar sua conformidade com a rotulagem exigida pela legislação brasileira (BRASIL, 2003). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o sistema analítico mais utilizado na detecção de OGMs devido sua alta sensibilidade e especificidade na amplificação do DNA (ANKLAM et al., 2002; HOLST-JENSEN et al., 2003; TAVERNIERS; VAN BOCKSTAELE; DE LOOSE, 2004, MIRAGLIA et al., 2004). A *nested* PCR é utilizada para confirmar o produto da PCR e permitir a distinção entre produtos de amplificação específicos e não específicos. Assim, o produto da PCR é reamplificado usando outro par de iniciadores que amplifica uma região interna da seqüência alvo original (ANKLAM et al., 2002). Isso aumenta a sensibilidade da PCR, permitindo a detecção de baixos níveis de OGM (ZIMMERMANN et al., 1998).

A fim de avaliar a presença de MON810, uma *nested* PCR foi empregada para análise de 81 produtos comerciais derivados do milho (farinha, fubá, biju e polenta). As amostras foram

adquiridas de supermercados da região Sul do Brasil e duas amostras foram adquiridas na Argentina.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Amostras

Foram empregadas amostras de alimentos obtidos de supermercados do Estado de Santa Catarina, Brasil, e de Bernardo de Irigoyen, Província de Misiones, Argentina, no período de 2005 a 2007 totalizando 19 amostras de farinha de milho, 27 amostras de fubá, 13 amostras de biju (farinha de milho flocada) e 24 amostras de polenta (flocos de milho pré-cozido), sendo 81 amostras de alimentos brasileiros e uma amostra de farinha de milho e também uma amostra de polenta da Argentina. Para as amostras de alimentos brasileiros, um total de 14 diferentes marcas comerciais foram analisadas, incluindo 6 marcas de farinha de milho, 7 de fubá, 5 de biju e 3 de polenta. Material de referência certificado, (grãos de milho moído contendo 0,1 %, 1 % e 5 % de MON810, BF413b, BF413d e BF413f, respectivamente) provenientes do *European Reference Materials* (ERM, Geel, Bélgica), foram utilizados como controles positivos. Os controles negativos (quatro amostras de grãos de milho não GM moídos) foram cedidos gentilmente por produtores de Santa Catarina, Brasil. Todas as amostras foram estocadas a -20°C até a realização das análises.

3.2.3 Extração de DNA

Duas a três extrações independentes foram realizadas para cada amostra. O DNA genômico foi isolado a partir de 0,1 g das amostras trituradas usando o método do brometo de hexadeciltrimetil amônio (CTAB) de acordo com Lipp et al. (1999) e descrito conforme o protocolo 3 de Ferrari et al. (*in press*). A concentração e a pureza do DNA extraído foram estimadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm em espectrofotômetros Hitachi U1800 e U2010 (Hitachi High-Technologies, Tóquio, Japão).

3.2.4 Condições da PCR

Os pares de iniciadores da PCR usados para amplificação do gene da zeína (ZEO1/ZEO2) e para *nested* PCR do milho GM MON810 (mg1/mg2 e mg3/mg4) estão descritos na Tabela 3. Os iniciadores para a zeína foram usados como controle interno para amplificar um gene

endógeno do milho. Todos iniciadores da PCR foram sintetizados pela Invitrogen™ (Carlsbad, Califórnia, EUA).

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para detecção do gene da zeína do milho e do milho GM MON810.

Alvo	Iniciador	Seqüência (5'- 3')	Amplicon	Referência
gene da zeína	ZEO1	TGCTTGCATTGTTTCGCTCTCCTAG	329 pb	Cardarelli et al., 2005 Cardarelli et al., 2005
	ZEO2	GTCGCAGTGACATTGTGGCAT		
Milho GM MON810	mg1	TATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC	401 pb	Zimmermann et al., 1998 Zimmermann et al., 1998
	mg2	TGCCCTATAACACCAACATGTGCTT		
	mg3	ACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTC	149 pb	Zimmermann et al., 1998 Zimmermann et al., 1998
	mg4	GCATTTCAGAGAAACGTGGCAGTAAC		

Todas as amplificações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 2 µL da solução de DNA (50 ng/reacção), 1 unidade de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, EUA), tampão de PCR 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 160 µM de cada dNTP (200 µM quando os iniciadores ZEO1/ZEO2 foram usados) e 0,5 µM de cada iniciador. Após amplificação com os iniciadores mg1/mg2, 2 µL dos produtos da PCR foram usados como molde para *nested* PCR com os iniciadores mg3/mg4 para detecção específica do milho GM MON810.

As amplificações foram realizadas em termociclador Minicycler™ (MJ Research, Inc. Watertown, MA, EUA). Para os iniciadores ZEO1/ZEO2 foi realizada a desnaturação a 95°C por 3 min; seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min (CARDARELLI et al., 2005). Para os iniciadores mg1/mg2 e mg3/mg4 a desnaturação foi realizada a 95°C por 3 min; seguida por 35 ciclos (mg1/mg2) e 40 ciclos (mg3/mg4) a 95°C por 45s, 62°C por 50s, 72°C por 50s e extensão final a 72°C por 3 min (ZIMMERMANN et al., 1998).

A sensibilidade da *nested* PCR foi avaliada pelo uso de concentrações decrescentes de DNA do material de referência MON810 1 % e 0,1 %, cuja concentração foi ajustada para 25 ng/µL, diluído de forma seriada dez vezes em água ou com 25 ng/µL do DNA de amostras não GM. Os níveis de concentração foram escolhidos de acordo com o limite de detecção proposto por Zimmermann et al. (1998).

Quando os resultados de duas extrações da mesma amostra foram contraditórios, uma nova extração e uma nova detecção por *nested* PCR foram realizadas para esta terceira extração.

Devido ao alto risco de contaminação acidental das amostras e dos reagentes pela contaminação cruzada, passos individuais de PCR foram realizados separadamente em termos de espaço físico. Os reativos de PCR adicionados à água ao invés do extrato de DNA foram analisados como controle da reação de PCR e, para todas as amostras, uma série de controles positivos e negativos foi analisada para garantir a exatidão dos resultados (HÜBNER, STUDER, LUTHY, 1999).

3.2.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2 % em tampão TBE 1X (10 mM Tris-borato, EDTA pH 8,0) e corados com brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada a 80V e 400 mA por 30 minutos (detecção do gene zeína) ou 50 minutos (detecção de MON810) conforme adaptação das condições originais de Cardarelli et al. (2005) e Zimmermann et al. (1998). A visualização do gel foi realizada em transiluminador UV e as imagens foram registradas com câmera digital Canon Powershot A70 (Canon Inc., Tóquio, Japão).

3.3 Resultados e Discussão

Todas as amostras de milho amplificaram um fragmento de 329 pb do gene da zeína e revelaram a presença de DNA amplificável de milho. Este fragmento esteve ausente na água e nos controles negativos, corroborando a ausência de contaminação na PCR e no processo de extração de DNA.

Algumas amostras de biju, de polenta e de fubá estão representadas na Figura 11.

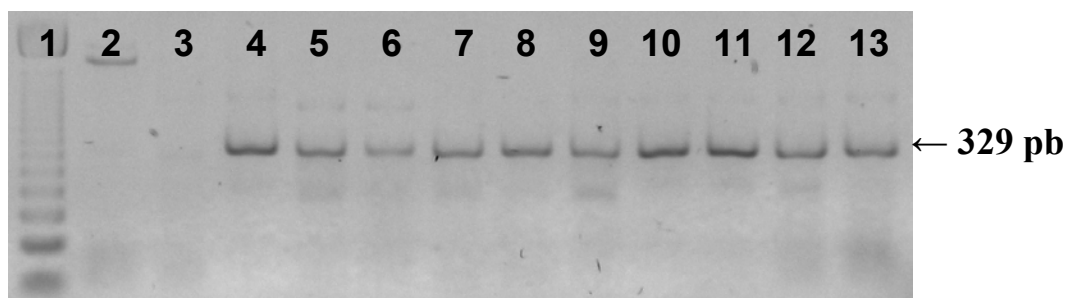


Figura 11 - Detecção de DNA amplificável do milho por PCR com os iniciadores ZEO1/ZEO2.

Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50 bp (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle negativo (extrato de soja); canaleta 4: grão de milho; canaletas 5-6: amostra de biju (B8); canaletas 7-11: amostras de polenta (P16, P17, P18, P19, P20, respectivamente); canaletas 12-13: amostras de fubá (A17 e A18); (10 μ L do produto da PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

Os resultados obtidos para detecção de MON810 estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Detecção do milho GM MON810 em alimentos derivados de milho.

Amostras	Alimentos derivados do milho (código)	Amostras analisadas	Amostras positivas para o gene da zeína	Amostras positivas para MON810
Brasileiras	farinha de milho (F)	18	18	nd
	fubá (A)	27	27	nd
	biju (B)	13	13	nd
	polenta (P)	23	23	nd
Argentinas	farinha de milho (H1)	1	1	1
	polenta (H2)	1	1	1

nd = não detectado, abaixo do limite de detecção de 0,1%.

Na *nested* PCR realizada com os iniciadores mg1/mg2 e mg3/mg4, os materiais de referência de milho GM MON810 (0,1 %, 1,0 % e 5,0 %) apresentaram o amplicon esperado de 149 pb (Figura 12a). As amostras de alimentos argentinos foram positivas para a presença de MON810. Nas canaletas 5 e 6 (Figura 12 b) observa-se o resultado positivo para a amostra de alimento argentino H1. As 81 amostras de alimentos brasileiros foram todas negativas para este amplicon. Algumas destas amostras de biju, de farinha de milho e de fubá estão representadas na Figura 12c.

Doze amostras de alimentos brasileiros geraram o amplicon de 149 pb na *nested* PCR com uma das extrações de DNA e não geraram o amplicon com uma segunda extração de DNA. Nas extrações de DNA e PCR das amostras em triplicata, amostras que geraram o amplicon esperado de MON810 somente para uma extração foram consideradas negativas.

Provavelmente estas amostras estão abaixo do limite de detecção de 0,1 %, como por exemplo, a amostra de farinha de milho (F14) na canaleta 9 da Figura 12a.

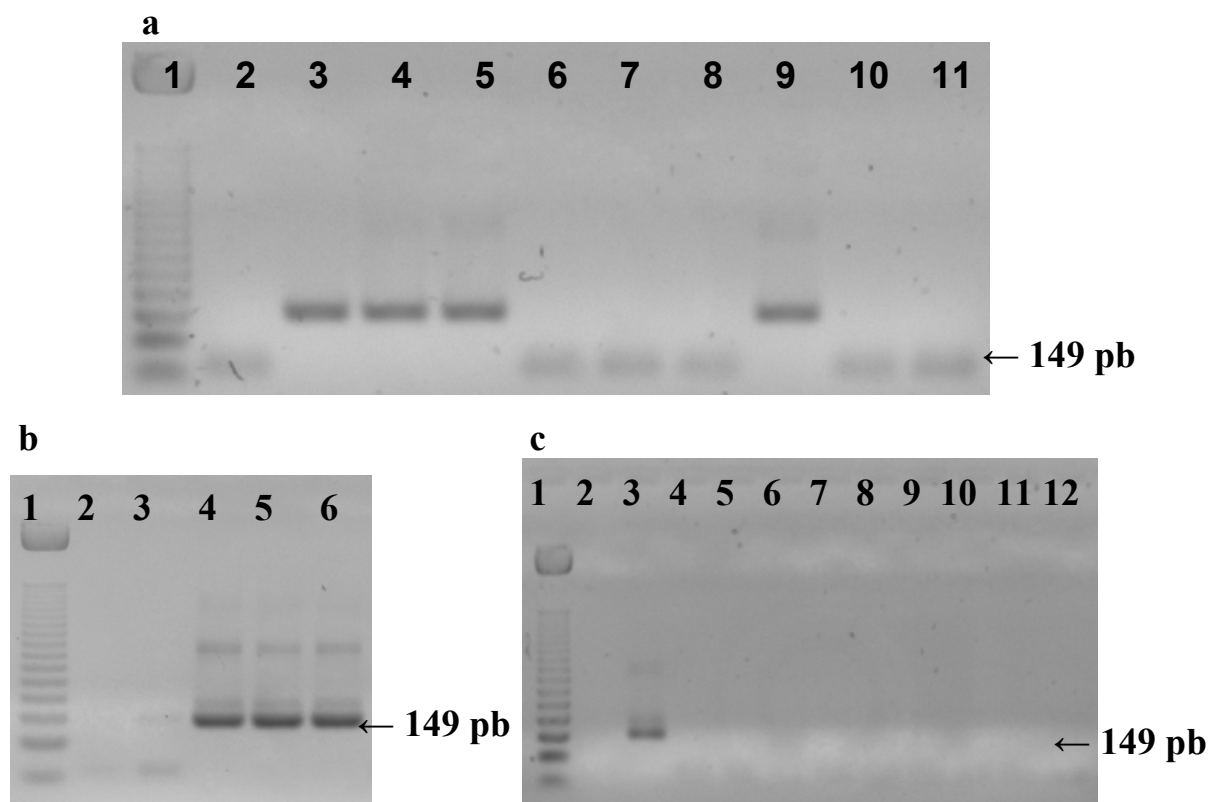


Figura 12 - Detecção do milho MON810 por *nested* PCR com os iniciadores mg1/mg2 e mg3/mg4.

(a) Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50 pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: milho GM MON810 0,1 %; canaleta 4: milho GM MON810 1 %; canaleta 5: milho GM MON810 5 %; canaleta 6: controle negativo (grão de milho não GM); canaletas 7-9: amostras de farinha de milho (F12, F13 e F14, respectivamente); canaletas 10-11: amostras de fubá (A19 e A20, respectivamente); (25 μ L do produto de PCR product + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

(b) Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50 pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: controle negativo (grão de milho não GM); canaleta 4: milho GM MON810 0,1 %; canaletas 5-6: amostra de farinha de milho da Argentina (H1 em duplicata); (10 μ L do produto de PCR product + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

(c) Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50 pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: milho GM MON810 1 %; canaleta 4: controle negativo (grão de milho não GM); canaletas 5-6: amostra de biju (B3 em duplicata); canaletas 7-8: amostra de biju (B4 em duplicata); canaletas 9-10: amostra de farinha de milho (F8 em duplicata); canaletas 11-12: amostra de fubá (A9 em duplicata); (25 μ L do produto de PCR product + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

O amplicon de 149 pb foi sempre detectado para os padrões MON810 1 % e 0,1 %. Para o padrão MON810 0,01 %, a detecção do amplicon em gel de agarose foi variável (Figura 13), representando um limite de detecção de 0,1 % para MON810 conforme as condições de PCR utilizadas no presente trabalho.

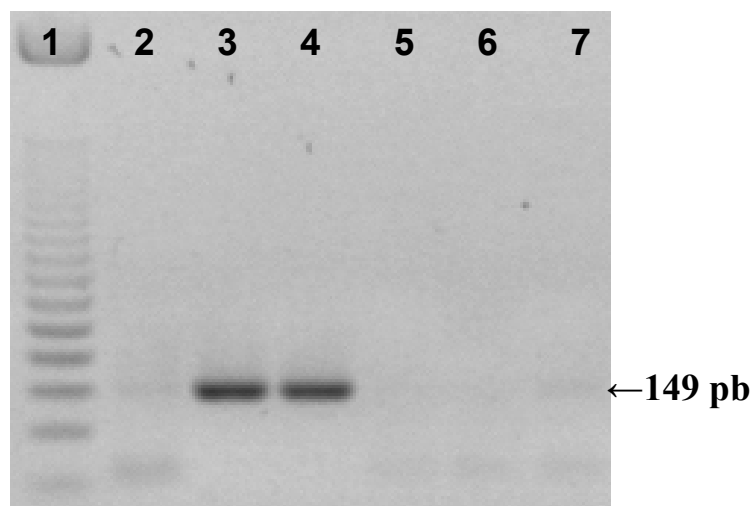


Figura 13 - Sensibilidade da *nested* PCR para MON810 utilizando concentrações decrescentes de DNA do padrão MON810 1 % em diluições seriadas (1:10, v/v) em água.

Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50 pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: milho GM MON810 0,1%; canaleta 4: milho GM MON810 0,01%; canaleta 5: milho GM MON810 0,001%; canaleta 6: milho GM MON810 0,0001%; canaleta 7: DNA do milho não GM; (25 μ L do produto de PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

A presença de inibidores no DNA da amostra (resíduos de polissacarídeos, lipídios, polifenóis, reativos da extração) dificulta e às vezes até impede a amplificação do DNA por PCR (ANKLAM et al., 2002). Além disso, o DNA endógeno está presente em maior quantidade em relação ao DNA recombinante. Assim, a chance da PCR convencional amplificar o gene endógeno, neste caso, o gene da zeína, é maior que amplificar o DNA recombinante, neste caso, o DNA específico da linhagem MON810. Uma forma de confirmar que um resultado negativo não é um falso negativo induzido por inibidores da PCR é a adição de DNA da amostra GM ao DNA da amostra não GM em um experimento paralelo (PERMINGEAT et al., 2002). Quatro amostras diferentes (farinha, fubá, biju e polenta) que obtiveram resultados negativos na *nested* PCR para detecção de MON810 foram analisadas usando uma mistura de reação de PCR contendo o equivalente a 0,01% e 0,1% de MON810. O DNA do material certificado 1 % ou 0,1 % de MON810 foi adicionado (1:10, v/v) ao DNA de cada uma das amostras não GM e a *nested* PCR foi realizada para detecção de MON810. Resultados positivos foram variáveis em diluições contendo 0,01 % de MON810 como concentração final conforme observado nas canaletas 5 e 12 da Figura 14.

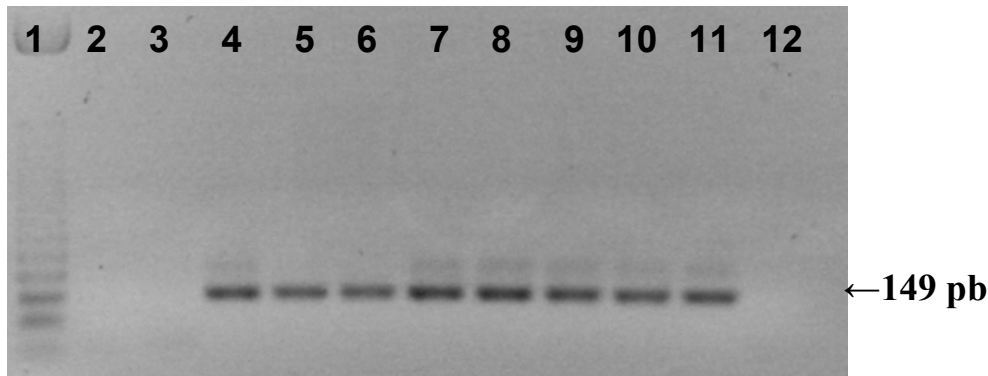


Figura 14 - Sensibilidade da *nested* PCR para MON810 utilizando DNA de padrões MON810 adicionado ao DNA de cada amostra não GM.

Canaleta 1: padrão de peso molecular de 50 pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (água); canaleta 3: DNA de milho não GM; canaleta 4: milho GM MON810 0,1 % (amostra padrão); canaleta 5: milho GM MON810 0,01 % (amostra diluída); canaleta 6: milho GM MON810 0,1 % (amostra diluída); canaleta 7: milho GM MON810 1 % adicionado em grão de milho não GM (1:10, v/v); canaleta 8: milho GM MON810 1 % adicionado em farinha de milho não GM (1:10, v/v); canaleta 9: milho GM MON810 1 % adicionado em fubá não GM (1:10, v/v); canaleta 10: milho GM MON810 1 % adicionado em polenta não GM (1:10, v/v); canaleta 11: milho GM MON810 1 % adicionado em biju não GM (1:10, v/v); canaleta 12: milho GM MON810 0,01% (amostra diluída); (25 μ L do produto de PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta).

Por outro lado, todas as amostras que continham 0,1 % de MON810 revelaram a presença do amplicon de 149 pb (Figura 14). Estes resultados concordam com Zimmermann et al. (1998) ao indicar que, nas condições usadas, a presença de DNA de milho não GM não diminuiu a sensibilidade do sistema de detecção e os resultados negativos da *nested* PCR não foram falso negativos.

Existem poucos relatos sobre a distribuição de OGM em alimentos comerciais publicados na literatura, apenas quatro no Brasil e um na Argentina (CARDARELLI et al., 2005; GREINER, KONIETZNY, VILLAVICENCIO, 2005; BROD et al., 2007; BROD & ARISI, 2007; MARGARIT et al., 2006). Greiner, Konietzny, Villavicencio (2005) analisaram 100 alimentos contendo milho comercializados no Brasil nos anos 2000 e 2001: 3 do total de 18 amostras de farinha de milho e 6 do total de 18 amostras de polenta continham milho GM Bt11 e MON810 que foram identificados como as linhagens predominantes de milho GM. Cardarelli et al. (2005) analisaram 40 alimentos contendo milho comercializados no Brasil, 25 do total de 40 apresentaram DNA amplificável para o milho e em nenhum deles houve a presença de milho GM MON810 nem Event176. Greiner, Konietzny, Villavicencio (2005) utilizaram o kit Wizard para extração de DNA e analisaram alimentos processados onde o milho é o ingrediente principal (farinha, polenta, *tortilla chips*), Cardarelli et al. (2005) utilizaram o método CTAB para extração do DNA e analisaram alimentos em matrizes

complexas (salsicha, sopa desidratada, ração animal). As amostras analisadas por Greiner, Konietzny, Villavicencio (2005) foram adquiridas antes da implementação da legislação brasileira sobre alimentos GM (BRASIL, 2003). Margarit et al. (2006) investigaram a presença de milho GM em 32 amostras de alimentos comercializados na Argentina e 8 do total de 32 amostras apresentaram resultado positivo para as linhagens MON810 ou Event176.

3.4 Conclusão

Os resultados deste trabalho demonstraram ausência de produtos contendo milho MON810, considerando o limite de detecção de 0,1%, em 81 amostras de alimentos brasileiros (farinha, fubá, biju e polenta) adquiridos no comércio entre os anos de 2005 e 2007. A presença de MON810 foi observada em duas amostras de alimentos comercializadas na Argentina. A *nested* PCR mostrou um limite de detecção de 0,1% na detecção do milho MON810. Comprovou-se a eficiência do método de extração CTAB e da *nested* PCR para detecção da linhagem MON810 em amostras de farinha de milho, fubá, biju e polenta, bem como o cumprimento da legislação brasileira atual referente à rotulagem de alimentos contendo OGM (Brasil, 2003). Este é o primeiro trabalho relatando dados referentes a detecção de milho GM após a publicação do decreto nº 4680 (Brasil, 2003) que estipula diretrizes sobre rotulagem de alimentos contendo OGM

Agradecimentos

Este trabalho recebeu financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq processo 476598/ 2003-6, e da Fundação de Amparo e Pesquisa de Santa Catarina, FAPESC, Brasil. AZD foi bolsista CAPES, Ministério da Educação, Brasil.

3.5 Referências

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 Technology**, v. 214, p. 3-26, 2002.

BRASIL. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes

alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 abr. 2003.

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**, v. 40, p. 748-751, 2007.

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

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**, v. 16, p. 859-866, 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**, 2006, *In Press*, doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01405.

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-methods. **Food Control**, v. 16, p. 753-759, 2005.

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

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

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006**, ISAAA Briefs, v. 35; International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications: Ithaca, NY; 2006. Disponível em: < <http://www.isaaa.org/> > Acesso em: 01.02.2007.

LIPP, M., BRODMANN, P., PIETSCH, K., PAUWELS, J., ANKLAM, E. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. **Journal of AOAC International**, v. 82, p. 923-928, 1999.

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.

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.

MIRAGLIA, M., BERDAL, K.G., BRERA, C., CORBISIER, P., HOLST-JENSEN, A., KOK, E.J., MARVIN, H.J.P., SCHIMMEL, H., RENTSCH, J., VAN RIE, J.P.P.F., ZAGON,

J. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1157–1180, 2004.

PERMINGEAT, H. R., REGGIARDO, M. I., VALLEJOS R. H. Detection and Quantification of Transgenes in Grains by Multiplex and Real-Time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4431-4436, 2002.

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.

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.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na detecção qualitativa de DNA de milho GM em 64 amostras brasileiras, 18 amostras foram positivas para presença do gene *cryIA(b)* e 1 amostra foi positiva para presença do promotor P35S e do gene *cryIA(b)*. De 81 amostras brasileiras analisadas para detecção de MON810 nenhuma foi positiva, considerando o limite de detecção de 0,1%. Estes resultados confirmam a ausência da linhagem MON810 nas amostras analisadas. Contudo, é possível a presença de outras linhagens, tais como Bt11 ou Event 176, em função da detecção do gene *cryIA(b)* e do promotor P35S em diferentes amostras. Deve-se considerar que a presença do gene *cryIA(b)* nas amostras de milho pode advir do *Bacillus thuringiensis* aplicado nas plantações para controle de pragas e a presença de P35S pode advir do vírus do mosaico da couve-flor, apesar deste vírus ser comumente encontrado em crucíferas. Entretanto, a presença de ambos, promotor P35S e gene *cryIA(b)*, em uma mesma amostra é forte indício que a amostra contém milho GM.

A *nested* PCR com os iniciadores mg1/mg2 e mg3/mg4 mostrou-se adequada para verificar a presença de milho GM MON810 em todas as amostras. A sensibilidade da *nested* PCR para a detecção do MON810 permitiu detectar a presença de DNA recombinante nas amostras em nível de 0,1 % e isso está abaixo do limite mínimo exigido pela legislação brasileira para rotulagem de alimentos que é 1 % de OGM. As duas amostras de alimentos argentinas foram positivas para presença do promotor P35S, gene *cryIA(b)* e MON810 o que caracterizou a presença da linhagem MON810 comercializada na Argentina.

A extração de DNA em duplicata e triplicata apresentou resultados divergentes para diferentes extrações de uma mesma amostra o que pode indicar a heterogeneidade de material genético distribuído na amostra ou baixo nível de detecção da PCR para o gene *cryIA(b)* e P35S. A PCR para P35S não apresentou boa sensibilidade para os padrões GM MON810 mesmo após ajustes nas condições da PCR. Os protocolos de PCR qualitativa utilizados neste trabalho mostraram-se adequados para triagem de milho GM e para detecção de MON810 em alimentos contendo OGM. Sugere-se testar outros iniciadores para o P35S e faz-se necessária a detecção quantitativa das amostras positivas através da PCR em tempo real a fim de cumprir com a legislação brasileira que prevê a rotulagem de alimentos que contenham acima de 1 % de OGM.

São muitas as novas linhagens de milho aprovadas e comercializadas mundialmente. Torna-se necessário desenvolver metodologias capazes de identificar e quantificar diferentes linhagens, se possível, em uma única PCR multiplex.

APÊNDICES

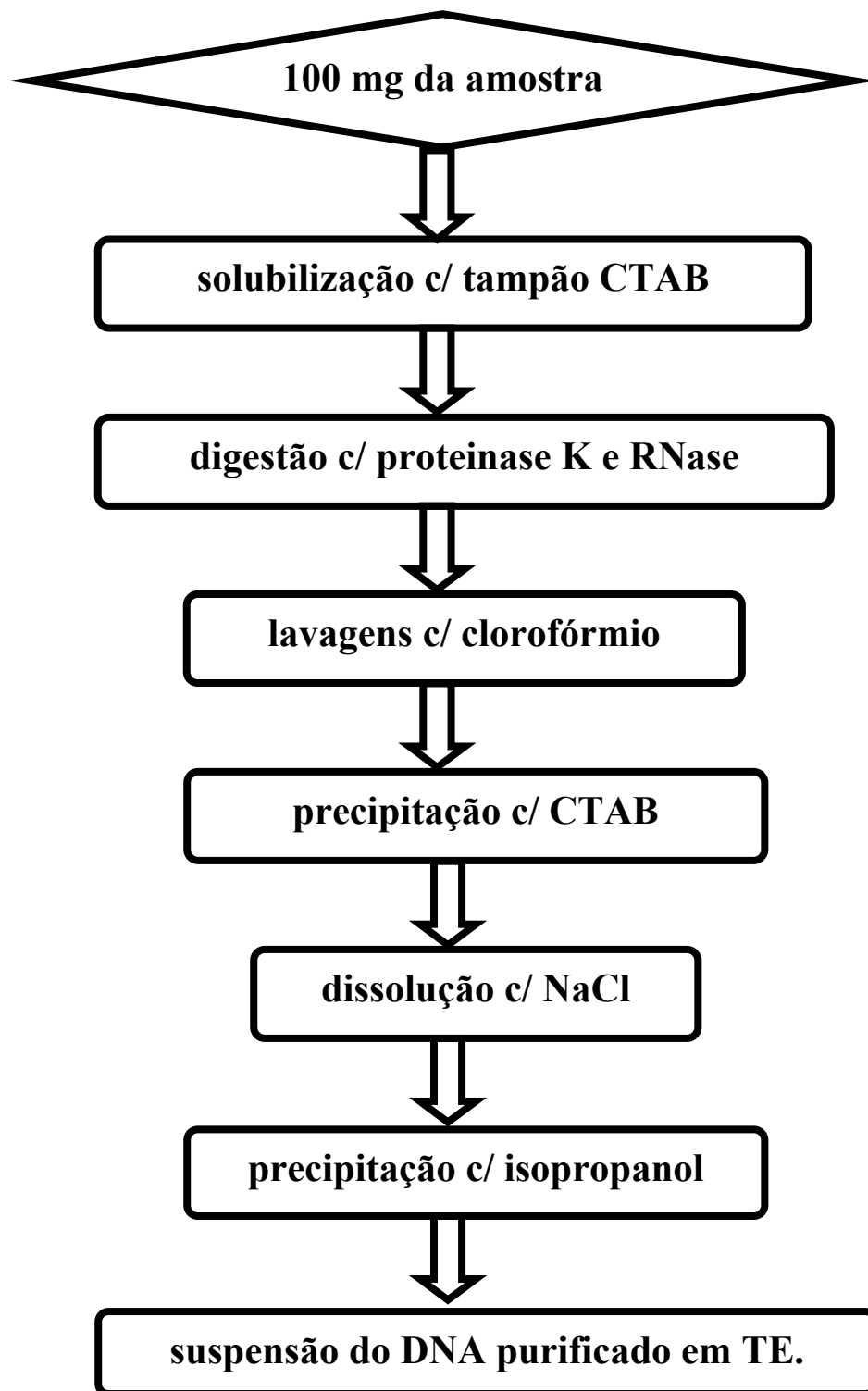
Apêndice A – Informações sobre as amostras comerciais de farinha de milho (F) e fubá (A).

Código	Marca	Validade
F1	V	11/2005
F2	S	25.10.05
F3	Y	12.03.06
F4	Z	14.09.06
F5	Y	21.05.06
F6	J	10.02.06
F7	H	30.06.2007
F8	J	23.05.06
F10	H	20.12.06
F11	Y	11.10.06
F12	Y	21.03.07
F13	Y	17.11.06
F14	V	11/2006
F15	O	01/2007
F16	Y	15.02.07
F17	Y	04.07.07
F18	Y	18.09.07
F19	Y	15.06.07
A3	Y	03.08.06
A4	S	02.06.06
A5	S	19.02.06
A6	S	25.04.06
A7	M	28.01.06
A8	Z	09.12.06
A9	M	28.03.06
A10	S	10.06.06
A11	S	18.05.06
A12	S	16.07.06
A13	Y	03.10.06
A15	Y	11.08.06
A17	Y	09.11.06
A18	Y	13.01.07
A19	S	12.11.06
A20	S	03.01.07
A21	D	12.10.06
A22	T	12.01.07
A23	R	23.12.06
A24	Y	26.03.07
A25	Y	29.03.07
A26	M	28.04.07
A27	Y	18.09.07
A28	Y	13.06.07
A29	S	26.06.07

Apêndice B – Informações sobre as amostras comerciais de biju (B) e polenta (P)

Código	Marca	Validade
B1	Y	22.06.06
B2	S	04.01.06
B3	K	30.12.05
B4	J	11/2006
B5	C	30.12.06
B6	K	03.11.07
B7	Y	30.08.06
B8	Y	12.01.07
B9	Z	10.04.07
B10	S	27.09.06
B11	Z	13.09.07
B12	Y	04.07.07
B13	Z	14.12.07
P1	Y	13.03.06
P2	S	30.03.06
P3	S	28.03.06
P4	S	14.05.06
P5	Y	24.07.06
P6	Y	11.08.06
P7	Q	Junho/06
P8	Q	Junho/06
P9	Y	13.09.06
P10	Q	Agosto/06
P11	Q	Julho/06
P12	S	23.02.06
P13	S	19.07.06
P14	S	04.05.06
P15	S	13.06.06
P16	Q	Set/2006
P17	Q	Fev/2007
P18	Q	Out/2006
P19	Y	03.01.07
P20	S	25.09.06
P21	Y	26.06.07
P22	S	03.04.07
P23	Y	04.07.07

Apêndice C – Fluxograma para extração de DNA



Apêndice D – Protocolo de extração de DNA

Foram pesadas 100 mg da amostra em tubos eppendorf de 2 mL e 800 µL de tampão CTAB foram adicionados (CTAB 20 g/L; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA). Após homogeneização em vortex, 20 µL de proteinase K 20 mg/mL foram adicionadas e novamente homogeneizadas, incubando em banho-maria a 64°C por 45 minutos, invertendo as amostras cuidadosamente a cada 15 minutos. 10 µL de RNase a 20 mg/mL foram adicionados e homogeneizados. Após incubação por mais 10 minutos a 64°C e centrifugação por 10 minutos a 13.000g, a fase aquosa (superior) foi transferida para novo tubo e 500 µL de clorofórmio foram adicionados. Após agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos a 13.000g, 500 µL da fase superior foram transferidos para novo tubo e mais 500 µL de clorofórmio foram adicionados. Após agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos a 13.000g, a fase superior foi transferida para novo tubo e dois volumes da solução de precipitação CTAB (CTAB 5g/L; 0,04M NaCl) foram adicionados. Após incubação em temperatura ambiente por uma hora e em seguida centrifugação por 5 minutos a 13.000g, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. O precipitado foi dissolvido com 350 µL de NaCl 1,2 M, após agitação em vortex, 350 µL de clorofórmio foram adicionados. Após, agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos a 13.000g até ocorrer a separação das fases. A fase superior foi transferida para novo tubo e 0,6 volumes de isopropanol foram adicionados para a precipitação do DNA. Após agitação e centrifugação por 10 minutos a 13.000g, o sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% foram adicionados. Após centrifugação por 4 minutos a 13.000g, o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado de DNA foi seco em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora e suspenso em 40 µL de Tampão TE (Tris-HCl 10 mM – pH 8; EDTA 1 mM) e estocado a 4°C por uma noite antes da armazenagem a - 20°C.

Apêndice E – Densidade Ótica do DNA extraído para diferentes amostras

Código:

M = padrões de referência MON810;

F = farinha de milho;

P = flocos de milho pré-cozido para preparo de polenta;

B = biju;

A = fubá.

Amostras	Peso (mg)	Abs(260.0)	Abs(280.0)	260/280
M1	102,5	0,073	0,04	1,83
M2	102,6	0,076	0,041	1,85
M3	108,8	0,107	0,059	1,81
F1	101,6	0,002	-0,005	-0,40
F2	100,6	0,006	0,003	2,00
F3	105	0,01	0,004	2,50
F4	100,7	0,013	0,007	1,86
F5	100,2	0,01	0,005	2,00
F6	102,2	0,015	0,011	1,36
F7	101,7	0,005	0,004	1,25
F8	100,2	0,023	0,013	1,77
F9	102,9	0,046	0,024	1,92
F10	103,2	0,064	0,028	2,29
F11	103,5	-0,004	-0,009	0,44
F12	104,5	0,011	0,006	1,83
F13	101,4	0,025	0,016	1,56
F14	100,2	0,026	0,016	1,63
F15	101,8	0,044	0,023	1,91
F16	103,1	0,009	0,004	2,25
F17	105,2	0,003	0,001	3,00
F18	106,5	0,007	0,003	2,33
F19	108,6	0,034	0,016	2,13
P1	105	0,018	0,005	3,60
P2	105	0,016	0,003	5,33
P3	101	0,011	0,004	2,75
P4	105,3	0,013	0,006	2,17
P5	105,8	0,019	0,009	2,11
P6	102,3	0,018	0,008	2,25
P7	102,7	0,021	0,011	1,91
P8	101,9	0,018	0,009	2,00
P9	100,9	0,019	0,011	1,73
P10	104,3	0,024	0,014	1,71
P11	106,1	0,024	0,014	1,71
P12	107,20	0,006	0,004	1,50
P13	102,9	0,01	0,005	2,00
P14	104,2	0,008	0,005	1,60
P15	100,8	0,007	0,004	1,75
P16	104,3	0,031	0,021	1,48
P17	101,6	0,042	0,027	1,56
P18	106	0,037	0,029	1,28

Continuação Apêndice E

Amostras	Peso (mg)	Abs(260.0)	Abs(280.0)	260/280
P19	104,6	0,024	0,015	1,60
P20	102,3	0,018	0,016	1,13
P21	107,5	0,005	0,001	5,00
P22	104	0,006	0,001	6,00
P23	108,5	0,004	0,001	4,00
B1	105,8	0,009	0,004	2,25
B2	102,7	0,01	0,005	2,00
B3	105,2	0,009	0,005	1,80
B4	102	0,015	0,007	2,14
B5	101,8	0,016	0,009	1,78
B6	103,4	0,023	0,013	1,77
B7	105	0,019	0,01	1,90
B8	104,3	0,015	0,009	1,67
B9	104,3	0,017	0,013	1,31
B10	104,3	0,011	0,008	1,38
B11	102,1	0,005	0,001	5,00
B12	103	0,001	-0,002	-0,50
B13	110,4	0,003	0,001	3,00
A1	102,8	0,015	0,009	1,67
A2	106,3	0,009	0,005	1,80
A3	104,5	0,021	0,013	1,62
A4	103,7	0,023	0,011	2,09
A5	101,8	0,048	0,024	2,00
A6	102,8	0,017	0,008	2,13
A7	105,9	0,034	0,017	2,00
A8	104,9	0,016	0,007	2,29
A9	100,9	0,026	0,015	1,73
A10	100,5	0,021	0,011	1,91
A11	101,1	0,031	0,018	1,72
A12	102,6	0,024	0,012	2,00
A13	102,8	0,02	0,011	1,82
A14	100,9	0,014	0,008	1,75
A15	105,5	0,011	0,005	2,20
A17	102,7	0,037	0,023	1,61
A18	101,5	0,044	0,026	1,69
A19	101,7	0,032	0,021	1,52
A20	101	0,012	0,007	1,71
A21	100,8	0,015	0,008	1,88
A22	104	0,014	0,007	2,00
A23	101,8	0,013	0,006	2,17
A24	108,5	0,005	0,001	5,00
A25	108,2	0,005	0,002	2,50
A26	100,2	0,008	0,002	4,00
A27	105,5	0,015	0,008	1,88
A28	101	0,02	0,008	2,50
A29	103,4	0,007	0,001	7,00

6 REFERÊNCIAS

ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias de Milho. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/processo3.html>> Acesso em: 26.01.07.

AGBIOS. Agencia de Informações em Biotecnologia. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php>> Acesso em: 26.01.07

AHMED, F.E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology**, v.20, n.5, p.215-223, 2002.

AKHTER, J., QUTUB, M., BURNHAM, N., AKHTAR, M. Genetically modified foods: Health and safety issues. **Annals of Saudi Medicine**, n.21. p.161-163, 2001.

ALARY, R.; SERIN, A.; MAURY, D.; JOUIRA, H.B.; 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.

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 Technology**, v.214, p.3-26, 2002.

BALTAZAR, M.B., SANCHEZ-GONZALEZ, J., DE LA CRUZ-LARIOS, L., SCHOPER, J.B. Pollination between maize and teosinte: an important determinant of gene flow in Mexico. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 110. p. 519–526, 2005.

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: 10.04.07.

BAUER, T.; WELLER, P.; HAMMES, W.P.; HERTEL, C. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. **European Food Research Technology**, v. 217, p.338-343, 2003.

BORDONI, R.; GERMINI, A.; MEZZELANI, A.; MARCHELLI, R.; DE BELLIS, G. A Microarray Platform for Parallel Detection of Five Transgenic Events in Foods: A Combined Polymerase Chain Reaction-Ligation Detection Reaction-Universal Array Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.912-918, 2005.

BRASIL. Lei n. 8.078, 11 de setembro de 1990. **Código de defesa do consumidor**.

Disponível em:

<<http://www.pge.sp.gov.br/centrodeestudos/bibliotecavirtual/dh/volume%20i/difulei8078.htm>>. Acesso em : 20 set 2005.

BRASIL. Decreto n° 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei n° 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a

partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 abr. 2003.

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. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 mar. 2005.

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.

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.

CAVALI, S.B. Segurança Alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. **Revista de Nutrição**, v.14, p.41-46, 2001.

CELEC, P.; KUKUÈKOVÁ, M.; RENCZÉSOVÁ, V.; NATARAJAN, S.; PÁLFFY, R.; GARDLÍK, R.; HODOSY, J.; BEHULIAK, M.; VLKOVÁ, B.; MINÁRIK, G.; SZEMES, T.; STUHLÍK, S.; TURÒA, J. Biological and biomedical aspects of genetically modified food. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. 59. p. 531–540, 2005.

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.

CONAB. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sétimo Levantamento de Avaliação da Safra Agrícola 2006/2007**. abr. 2007. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 25 jan.2007.

CTNBio. Parecer Técnico Prévio Conclusivo n. 530/2005. Parecer Técnico Conclusivo sobre a segurança alimentar para animais, dos eventos/híbridos de grãos de milho geneticamente modificado disponíveis no mercado mundial para comercialização. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, v. 114, n. 3, p. 5, 16 jun. 2003. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php?action=/content/view&cod_objeto=1299>. Acesso em 18 abr. 2006.

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 and Molecular Biology Reviews**, n. 62, p.807–813, 1995.

DEAVILLE, E. R.; MADDISON, B. C. Detection of transgenic and endogenous plant dna fragments in the blood, tissues, and digesta of broilers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 53, p.10268-10275, 2005.

DI PINTO, A.; FORTE, V.T.; GUASTADISEGNI, M.C.; MARTINO, C.; SCHENA, F.P.; TANTILLO, G. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. **Food Control**, n. 18. p.76–80, 2007.

ERMOLLI, M.; FANTOZZI, A.; MARINI, M.; SCOTTI, D.; BALLA, B.; HOFFMANN, S.; QUERCI, M.; PAOLETTI, C.; VAN DEN EEDE, G. Food safety: screening tests used to detect and quantify GMO proteins. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, p. 55–57, 2006.

FLACHOWSKY, G.; AULRICH, K.; BÖHME, H.; HALLE, I. Studies on feeds from genetically modified plants (GMP) – Contributions to nutritional and safety assessment. **Animal Feed Science and Technology**, n.133. p.2-30, 2007.

GERMINI, A.; ZANETTI, A.; SALATI, C.; ROSSI, S.; FORRÉ C.; SCHMID, S.; MARCHELLI, R. Development of a Seven-Target Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of Transgenic Soybean and Maize in Feeds and Foods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p.3275-3280, 2004.

GOGGI, A. S.; CARAGEA, P.; LOPEZ-SANCHEZ, H.; WESTGATE, M.; ARRITT, R.; CLARK, C. Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields. **Field Crops Research**, n. 99, p. 147–157, 2006.

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-methods. **Food Control**, v.16, p.753-759, 2005.

GRUÈRE, P.G. A preliminary comparison of the retail level effects of genetically modified foods labelling policies in Canada and France. **Food Policy**, n.31. p.148-161, 2006.

GUIMARÃES, V.D.A.; ALVES, R.L. **Cepea Milho – Informações de Mercado**. Agromensal – ESALQ/BM&F, jan. 2007. Disponível em: http://www.cepea.esalq.usp.br/agromensal/2007/01_janeiro/Milho.htm> Acesso em 09 mar.2007.

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

HILBECK, A. Implications of transgenic, insecticidal plants for insect and plant biodiversity. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 4/1, p. 43–61, 2001.

HÖHNE, M.; SANTISI, C. R.; MEYER, R. Real-time multiplex PCR: An accurate method for the detection and quantification of 35S-CaMV promoter in genetically modified maize-containing food. **European Food Research Technology**, n.215, p.59-64, 2002.

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

HUANG, H.Y.; PAN, T.M. Detection of Genetically Modified Maize MON810 and NK603 by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3264-3268, 2004.

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

HUPFER, C.; HOTZEL, H.; SACHSE, K.; ENGEL, K.H. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, v.206, p.203-207, 1998.

IBOPE. Instituto Brasileiro de Pesquisa Estatística. **Pesquisa de opinião pública sobre transgênicos**. OPP 081. Brasil, julho, 2001. Disponível em: <[http://www2.ibope.com.br/CalandraKBX/filesmng.nsf/Opiniao%20Publica/Downloads/greenpeace.pdf/\\$File/greenpeace.pdf](http://www2.ibope.com.br/CalandraKBX/filesmng.nsf/Opiniao%20Publica/Downloads/greenpeace.pdf/$File/greenpeace.pdf)> Acesso em: 08 set.2005.

JAMES, D.; SCHMIDT, A. M.; WALL, E.; GREEN, M.; MASRI, S. Reliable Detection and Identification of Genetically Modified Maize, Soybean, and Canola by Multiplex PCR Analysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.5829-5834, 2003.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006**. ISAAA Brief n.35. ISAAA: Ithaca, NY. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/35/executivesummary/pdf/Brief%2035%20-%20Executive%20Summary%20-%20Portuguese.pdf>> Acesso em: 21 jan. 2007.

JANKIEWICZ, A.; BROLL, H.; ZAGON, J. The official method for the detection of genetically modified soybeans (German Food Act LMBG B 35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistant Bt maize (Maximizer). **European Food Research Technology**, v.209, p.77-82, 1999.

JOUANIN, L., BONADE-BOTTINO, M., GIRARD, C., MORROT, G., GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, n.131.p.1-11, 1998.

KISHORE, G.M.; SHEWMAKER, C. Biotechnology: Enhancing human nutrition in developing and developed worlds. **Proceedings National Academic Science USA**, v. 96, p. 5968–5972, 1999.

KÖNIG, A.; COCKBURN, A.; CREVEL, R.W.R.; DEBRUYNE, E.; GRAFSTROEM, R.; HAMMERLING, U.; KIMBER, I.; KNUDSEN, I.; KUIPERI, H.A.; PEIJNENBURG, A.A.C.M.; PENNINKS, A.H.; POULSEN, M.; SCHAUZU, M.; WAL, J.M. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. **Food and Chemical Toxicology**, n 42. p. 1047–1088, 2004.

KUIPER, H., KLETER, G.A. The scientific basis for risk assessment and regulation of genetically modified foods. **Trends in Food Science and Technology**, n.14. p.277-293, 2003.

LACK, G. Clinical risk assessment of GM foods. **Toxicology Letters**, n.127. p.337-340, 2002.

LAJOLO, F.; NUTTI, M.R. Transgênicos: bases científicas da sua segurança. **Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, 2003.

LIPP, M.; BRODMANN, P.; PIETSCH, K.; PAUWELS, J.; ANKLAM, E. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. **Journal of AOAC International**, v.82, n.4, p.923-928, 1999.

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

LIPP, M.; SHILLITO, R.; GIROUX, R.; SPIEGELHALTER, F.; CHARLTON, S.; PINERO, D.; SONG, P. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of AOAC International**, v.88, n.1, p. 136-155, 2005.

LOGUERCIO, L. L.; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. Milho Bt. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.24, p. 46-52, jan.-fev., 2002.

MACARTHUR, R.; MURRAY, A.W.A.; ALLNUTT, T.R.; DEPPE, C.; HIRD, H.J.; KERINS, G.M.; BLACKBURN, J.; BROWN, J.; STONES, R.; HUGO, S. Model for tuning GMO detection in seed and grain. **Nature Biotechnology**, v.25, n.2, 2007.

MALARKEY, T. Human health concerns with GM crops. **Mutation Research**, n.544.p.217-221, 2003.

MARCELINO, F.C.; MARTINS, M.F.; PIMENTA, M.A.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Detecção de resíduos de transgênicos em grãos e produtos derivados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.31, p.14-17, jul./dez., 2003.

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.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; PAPATHOMA, A.; NERANTZIS, E.; BETZIOS, B.; DOURTOGLOU, V.; MONCANY, M. Quantitative and qualitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food. **Food Reviews International**, v.20, n.3, p.275-296, 2004.

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.

MEYER, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. **Food Control**, v.10, p. 391, 1999.

MIRAGLIA, M.; BERDAL, K.G.; BRERA, C.; CORBISIER, P.; HOLST-JENSEN, A.; KOK, E.J.; MARVIN, H.J.P.; SCHIMMEL, H.; RENTSCH, J.; VAN RIE, J.P.P.F.; ZAGON, J. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1157–1180, 2004.

NAKAJIMA, O.; TESHIMA, R.; TAKAGI, K.; OKUNUKI, H.; SAWADA, J. ELISA method for monitoring human serum IgE specific for Cry1Ab introduced into genetically modified corn. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, n. 47, p.90-95, 2007.

NELSON, L.D.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3 ed. New York: Worth, 2000, 1152p.

NETO, S.B. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2005-2006**. Disponível em: <http://www.icepa.com.br/Publicacoes/Milho_2006.pdf> Acesso em: 26.01.07 (a)

NETO, S.B. **Milho - Leilões da Conab e exportações proporcionam melhor liquidez ao mercado - 18/12/2006**. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/>> Acesso em: 26.01.07 (b)

NETO, S.B. **Milho – Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2003-2004**. Disponível em: <http://www.icepa.com.br/Publicacoes/Milho_2004.pdf>. Acesso em: 10 out. 2005.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Plantas transgênicas e seus produtos: impactos, riscos e segurança alimentar – Biossegurança de plantas transgênicas. **Revista de Nutrição**, v.16, n.1, p.105-116, 2003.

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, 9713-9721, 2005.

PAN, T. M. Current Status and Detection of Genetically Modified Organism. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n.4, p. 229-241, 2002.

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.it/docs/session%2004.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2005.

QUIST, D.; CHAPELA, I.H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. **Nature**, v.414, p.541-543, 29 nov. 2001.

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

RODA, A.; MIRASOLI, M.; GUARDIGLI, M.; MICHELINI, E.; SIMONI, P.; MAGLIULO, M. Development and validation of a sensitive and fast chemiluminescent enzyme

immunoassay for the detection of genetically modified maize. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p.1269–1275, 2006.

SMITH, D.S.; MAXWELL, P.W. Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn Xour and cornstarch. **Food Control**, n.18. p. 236–242, 2007.

SOLERI, D.; CLEVELAND, A.D. Transgenic maize and Mexican maize diversity: Risky synergy? **Agriculture and Human Values**, n. 23. p. 27–31, 2006.

SOMMA, M. Extraction and purification of DNA. In: The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. Session 4. **Joint Research Centre**, 2004. Disponível em: <<http://gmotraining.jrc.it/docs/session%2005.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2005.

SOMMA, M.; QUERCI, M. The Polimerase 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 jul. 2005.

TAVARES, C.E.C. **Análise prospectiva do mercado de milho – safra 2004/05**. Brasília, abril, 2004. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 22 ago. 2005.

TENGEL, C.; SCHUSSLER, P.; SETZKE, E.; BALLE, J.; SPRENGER-HAUSSELS, M. PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. **Biotechniques**, v.31, n.2, p.426-429, 2001.

THOMSON, J. Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health. **Trends in Food Science and Technology**, n.14, p. 210-228, 2003.

TRIPATHI, L. Techniques for detecting genetically modified crops and products. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n.13, p. 1472-1479, 2005.

UZOGARA, S.G. The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: a review. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 179-206, 2000.

VALENTE, L.L. **Comparação de métodos para extração de DNA de produtos derivados de soja**. 2005, p.36-38. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VAN DUIJN, G.; VAN BIERT, R.; BLEEKER-MQRCELIS, H.; PEPPELMAN, H.; HESSING, M. Detection methods for genetically modified crops. **Food Control**, v.10, p. 375, 1999.

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.

WEHRMANN, A.; VLIET, A. V.; OPSOMER, C.; BOTTERMAN, J.; SCHULZ, A. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 1274 – 1278, 1996 (RESUMO) Disponível

em:<<http://www.nature.com/nbt/journal/v14/n10/abs/nbt1096-1274.html>> Acesso em: 07 out. 2005.

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 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.

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.