



Liliana Gonçalves Grazina

Deteção e quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos por técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra e coorientada pelo Professor Doutor Fernando Jorge dos Ramos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Liliana Gonçalves Grazina

Deteção e quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos por técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra
e coorientada pelo Professor Doutor Fernando Jorge dos Ramos e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Com os objetivos alcançados, quero agradecer a todos que o tornaram possível:

Em primeiro lugar, quero agradecer à Doutora Isabel Mafra, por ter aceitado orientar-me, por todos os conhecimentos que me transmitiu, bem como a disponibilidade, compreensão e preocupação que demonstrou ter para comigo.

À Professora Doutora Beatriz Oliveira, por me ter recebido no laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter proporcionado a hipótese de trabalhar com a sua equipa de laboratório, bem como por ter disponibilizado todos os recursos necessários para a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Ramos por ter aceitado a coorientação e pela disponibilidade demonstrada.

À Lorena Manzanares pela ajuda que foi tão importante no início deste trabalho.

Ao Telmo pela ajuda e disponibilidade que sempre demonstrou e que foi fundamental para chegar até aqui.

À Caterina e Liliana pela amizade, companheirismo e apoio em horas mais difíceis!

À Alexandra pela participação no trabalho.

À Anabela Costa e à Anabela Borges pela disponibilidade e apoio no laboratório.

Aos meus pais por todo o suporte familiar que me ofereceram e sem o qual não teria sido possível concretizar este trabalho e também pela amizade, carinho, amor e ajuda. Obrigada por tudo e por acreditarem em mim!

À minha irmã Ana, por todo o apoio, ajuda, amizade e pelo acompanhamento ao longo de todo o percurso.

Agradeço também a duas pessoas muito especiais: o meu filho e o meu marido por todo o apoio, sacrifício, compreensão e por estarem sempre ao meu lado, mesmo que isso tenha representado, muitas vezes, uma distância física! Obrigado Martim por seres meu filho e Helder meu marido.

Os meus agradecimentos dirigem-se também para os meus avós, tia, sobrinhos e sogros por todo o apoio e carinho.

Por fim quero agradecer a alguém que, apesar de já não estar presente fisicamente, foi alguém muito importante e com um papel fundamental para eu ser quem sou! Agradeço à minha avó Cândida por toda amizade, carinho, apoio, ajuda e amor que me deu ao longo da minha vida e nas horas menos boas e que contribuíram para eu chegar aqui!

Resumo

Desde que se iniciou o cultivo de plantas transgênicas, a soja tem sido a principal cultura a nível global. A linhagem de soja GTS 40-3-2 autorizada pela União Europeia (UE) e comercializada com o nome de soja Roundup Ready™ (RR) foi desenvolvida pela empresa Monsanto para permitir a sua tolerância ao glifosato, o ingrediente ativo do herbicida RR. Desde a entrada de organismos geneticamente modificados (OGM) na cadeia alimentar têm surgido várias preocupações, quer a nível do público em geral, quer a nível científico, relativamente à sua segurança. Por este motivo, a UE tem dedicado uma atenção especial à legislação relativa à presença de OGM, obrigando à rotulagem da presença acidental ou inevitável de OGM na proporção acima de 0,9%, por considerar necessário garantir a informação completa e fiável dos consumidores. Tal facto, torna a necessária a verificação da conformidade da rotulagem através de metodologias analíticas adequadas. Os métodos baseados no ADN, nomeadamente a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm-se mostrado os mais adequados para a deteção e quantificação de OGM.

O objetivo deste trabalho consistiu em detetar e quantificar a presença do evento RR da soja em alimentos à base de soja disponíveis no mercado, com diferentes níveis de processamento. Quatro fases experimentais foram então realizadas: (i) extração do ADN; (ii) amplificação do gene da lectina; (iii) deteção de soja RR; e (iv) Quantificação do evento soja RR. *Primers* específicos para o evento RR da soja foram usadas para amplificar um fragmento esperado de 103 pb utilizando materiais de referência certificados, contendo 0%, 0,1%, 1%, 5% e 10%. Para a confirmação e quantificação do evento, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real com sondas fluorescentes de hidrólise do tipo TaqMan. A amplificação por PCR do gene de lectina da soja mostrou que foi possível obter ADN amplificável de soja em 80% das 91 amostras comerciais, apesar do elevado nível de processamento da grande maioria dos alimentos. A aplicação do ensaio de PCR em tempo real permitiu confirmar os 6 resultados positivos para a soja RR, mostrando que uma das amostras continha 21% de soja RR sem estar rotulada, enquanto as restantes apresentavam teores deste evento que variaram entre os 0,01% e os 0,39%. Assim, uma das amostras não se apresentava conforme a rotulagem obrigatória quanto à presença de OGM.

Palavras-chave: OGM; soja; PCR; alimentos.

Abstract

Since the beginning of genetically modified organisms (GMO) cultivation, soybean has been the main crop globally. The soybean line GTS 40-3-2 was authorized by the European Union (EU) and commercialized under the name Roundup Ready™ (RR) soybean. It was developed by Monsanto to allow glyphosate tolerance, the main active ingredient of the herbicide RR. Since GMO entered the food chain, several concerns from public in general and scientific community have arisen with regard to their safety. For this reason, the EU has dedicated special attention to legislation, requiring the labeling of accidental or unavoidable presence of GMO in the ratio above 0.9%, as it considers necessary to ensure complete and reliable consumer information. This fact makes it necessary to verify the conformity of labeling through the appropriate analytical methodologies. The DNA-based methods, including the polymerase chain reaction (PCR) have shown to be the most adequate for the detection and quantification of GMO.

The aim of this study was to detect and quantify the presence of RR event in soy foods available on the market, with different levels of processing. Four experimental steps were then performed: (i) DNA extraction; (ii) amplification of the lectin gene; (iii) RR soybean detection; and (iv) quantification of soybean event RR. Specific primers targeting soybean RR event were used to amplify a 103 bp fragment using certified reference materials containing 0, 0.1, 1, 5% and 10%. To confirm and quantify the event, real-time PCR using fluorescent TaqMan hydrolysis probes was applied. PCR amplification of the soybean lectin gene showed that it was possible to obtain soybean amplifiable DNA in 80% of the 91 commercial samples, despite the high level processing of most foods. The implementation of real-time PCR assay allowed confirming the 6 positive results for the presence of RR soybean, showing that one of the samples contained 21% of RR soybean without being labeled, while the remaining contents of the event ranged between 0.01% and 0.39%. Thus, one of the samples was not conform the mandatory labeling for the presence of GMO.

Keywords: GMO; soybean; PCR; foodstuffs.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
I COMPONENTE TEÓRICA	I
1.1 Introdução.....	3
1.2 Cultivo de OGM a nível mundial.....	4
1.3 Transformação genética de plantas.....	5
1.4 Riscos/benefícios dos OGM.....	6
1.5 Legislação	7
1.6 Métodos de deteção e quantificação de OGM	10
1.6.1 Métodos baseados na análise de proteínas	12
1.6.1.1 ELISA	12
1.6.1.2 Dispositivos com tiras de fluxo lateral.....	13
1.6.1.3 <i>Western Blot</i>	14
1.6.2 Métodos baseados na análise de ADN.....	14
1.6.2.1 Extração e isolamento de ADN	15
1.6.2.2 PCR qualitativa.....	15
1.6.2.3 Biossensores.....	18
1.6.2.4 PCR quantitativa	19
1.7 A soja geneticamente modificada	23
1.8 Objetivos e âmbito do trabalho.....	25
2 COMPONENTE EXPERIMENTAL	27
2.1 Material e métodos.....	29
2.1.1 Descrição das amostras	29
2.1.2 Preparação das amostras	29
2.1.3 Materiais de estudos interlaboratoriais.....	34
2.1.4 Materiais de Referência.....	34
2.1.5 Reagentes e Soluções	34
2.1.6 Extração do ADN	35
2.1.6.1 Método Wizard	36
2.1.6.2 Método Nucleospin	37

2.1.7	Análise do ADN extraído	37
2.1.8	PCR Qualitativa	38
2.1.9	PCR quantitativa em tempo real	39
2.2	Resultados e discussão.....	41
2.2.1	Avaliação da integridade, qualidade e pureza do ADN extraído.....	41
2.2.1.1	Integridade.....	41
2.2.1.2	Qualidade e pureza.....	41
2.2.2	PCR qualitativa.....	44
2.2.2.1	Amplificação do gene da lectina da soja	44
2.2.2.2	Amplificação de específica do evento de soja RR	46
2.2.2.3	Amplificação do gene universal para eucariotas	47
2.2.3	Quantificação por PCR em tempo real	48
2.3	Conclusão	55
3	REFERÊNCIAS	57

Índice de figuras

Figura 1 Esquema indicativo dos procedimentos laboratoriais na análise de OGM para verificação da conformidade com a legislação.	11
Figura 2 Elisa tipo <i>sandwich</i> (adaptada de http://www.abnova.com).....	13
Figura 3 Reação em cadeia da polimerase (adaptada de http://oceanexplorer.noaa.gov).....	17
Figura 4 Exemplo de construção de um evento GM (adaptada de Holst-Jensen et al. (2012)).....	18
Figura 5 Representação esquemática do mecanismo dos diferentes tipos de sondas específicas de sequências utilizadas na indução de emissão de fluorescência por PCR em tempo real. (a) Sondas TaqMan™; (b) Primers Scorpions™; (c) Molecular Beacons™ e (d) Tecnologia FRET (Mafra & Oliveira, 2005).	21
Figura 6 Cinética da PCR em tempo real (adaptada de Pestana, 2010).....	22
Figura 7 Esquema simplificado da construção inserida na soja RR (adaptado de Padgett et al. (1996)).	24
Figura 8 Amostras comerciais usadas neste trabalho.....	29
Figura 9 Eletroforese em gel de agarose 1%, do ADN extraído. Linha M – marcador HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). Linhas 1 a 5 – amostras comerciais. Linha B – branco de extração. Linhas 6 a 9 – amostras de farinhas do estudo Interlaboratorial (2014).	41
Figura 10 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação do gene da lectina, com os primers LE3-F e LE4-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linha CN – controlo negativo. Linha B – branco de extração. Linhas 1 a 5 - Materiais de referência de 0%, 0,1%, 1%, 2% e 5%, respetivamente.	44
Figura 11 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação das sequências específicas para o evento de soja RR, com os primers RRS-3J1-F e RRS-3J3-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linha CN – controlo negativo Linha B – branco de extração. Linhas 1 a 5 – materiais de referência de 0%, 0,1%, 1%, 2% e 5%, respetivamente 44	44
Figura 12 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do gene da lectina, com os primers LE3-F e LE4-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linhas 1 a 17 – amostras comerciais. Linha CN – controlo negativo.	45
Figura 13 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação do gene da lectina, com os primers LE3-F e LE4-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linha CN – controlo negativo. Linha B – branco de extração. Linhas 1 a 5 – amostras de materiais de referência. Linhas 6 a 9 – amostras de estudo interlaboratorial de 2014.	45
Figura 14 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação do gene da lectina, com os primers LE3-F e LE4-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linhas 1 a 6 – amostras comerciais. Linhas 7 e 8 – amostras do estudo interlaboratorial de 2015. CP – controlo positivo. CN – controlo negativo 46	46
Figura 15 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação das sequências específicas para o evento de soja RR, com os primers RRS-3J1-F e RRS-3J3-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linhas 1 a 7 – amostras comerciais. Linhas 8 a 11 - materiais de referência 0%, 0,1%, 1% e 10% de soja RR, respetivamente. Linha CN – controlo negativo..... 46	46

Figura 16 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação das sequências específicas para o evento de soja RR, com os primers RRS-3J1-F e RRS-3J3-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linha CN – controlo negativo Linha B – branco de extração. Linhas 1 a 5 - materiais de referência de 0%, 0,1%, 1%, 2% e 5%, respetivamente. Linhas 6 a 9 – amostras do estudo interlaboratorial de 2014.....	47
Figura 17 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação das sequências específicas para o evento de soja RR, com os primers RRS-3J1-F e RRS-3J3-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linhas 1 a 6 – amostras comerciais. Linhas 7 e 8 – amostras do estudo interlaboratorial de 2015. CP – controlo positivo. CN – controlo negativo.....	47
Figura 18 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação de uma sequência universal de eucariotas com os primers 18SRG-F/18SRG-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linhas 1 a 10 – amostras comerciais que não amplificaram para com os primers para o gene da lectina. CP – controlo positivo. CN – controlo negativo.....	48
Figura 19 Representação gráfica da fluorescência (Relative Fluorescence Units) em função do número de ciclos de PCR em tempo real para o gene endógeno da soja com utilização de sondas de hidrólise do tipo Taqman™	49
Figura 20 Curva de calibração para o gene da lectina da soja (gene endógeno) – Cycle Threshold (Ct) em função do logaritmo da quantidade de ADN.	50
Figura 21 Fluorescência (Relative Fluorescence Units) (para duas amostras) em função do número de ciclos de PCR em tempo real para o evento RR da soja, com utilização de sondas de hidrólise do tipo Taqman™	50
Figura 22 Curva de calibração para a soja RR – Cycle Threshold (Ct) em função do logaritmo da quantidade de ADN.....	51

Índice de tabelas

Tabela 1 Resumo da legislação Portuguesa e da União Europeia.....	9
Tabela 2 Principais diferenças entre métodos baseados na análise de proteínas e na análise de ADN (adaptada de Giovannini et al, 2002)	11
Tabela 3 Materiais de referência certificados (IRMM) utilizados neste trabalho	35
Tabela 4 <i>Primers</i> utilizados na amplificação por PCR qualitativa	38
Tabela 5 Componentes das misturas reacionais para os ensaios de PCR.....	39
Tabela 6 Condições de tempo e temperatura utilizadas nos ensaios PCR.....	39
Tabela 7 <i>Primers</i> e sondas utilizados na amplificação por PCR em tempo real	40
Tabela 8 Condições de tempo e temperatura dos ensaios de PCR em tempo real	40
Tabela 9 Componentes das misturas reacionais para os ensaios de PCR em tempo real	40
Tabela 10 Concentrações e purezas obtidas nos extratos de ADN das amostras comerciais analisadas.....	42
Tabela 11 Concentrações e quantidades de ADN dos padrões obtidos por diluição seriada de um extrato do material de referência com 10% de soja RR.....	48
Tabela 12 Valores médios de eficiência, correlação linear e declive das curvas de calibração obtidos para vários ensaios de PCR em tempo real.....	51
Tabela 13 Resumo geral dos resultados obtidos por PCR qualitativa e PCR em tempo real para a deteção da sequência endógena e específica do evento RR de soja GM em alimentos à base de soja existentes no mercado.....	52
Tabela 14 Resultados obtidos por PCR em tempo real para a amplificação do gene da lectina e sequência específica do evento RR em amostras de estudos interlaboratoriais	53
Tabela 15 Resumo dos resultados de deteção qualitativa da soja RR nas amostras analisadas, incluindo a deteção dos genes de referência e universal.....	53

Lista de abreviaturas

- AESA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
- APA – Agência Portuguesa do Ambiente
- ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
- CE – Comissão Europeia
- CGE-LIF – Electroforese capilar com deteção por fluorescência induzida por laser
- Ct – *Cycle Threshold*
- CTAB – Brometo de cetiltrimetilamónio
- EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
- ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- FDA – Food and Drug Administration
- GM – Geneticamente Modificado(s)
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- ISAAA – International Service for Acquisition of Agri-biotech Applications
- JRC – Joint Research Center
- LFD – Tiras de Fluxo Lateral
- LPA – Ligation-dependent Probe Amplification
- NIR – Espectrometria do Infravermelho próximo
- OGM – Organismo(s) Geneticamente Modificado(s)
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- pb – pares de bases
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- QC-PCR – PCR quantitativa competitiva
- SDS – Dodecilsulfato de Sódio
- SDS-PAGE – Electroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio
- SPR – *Surface Plasmon Resonance*
- Taq – *Thermus aquaticus*
- T_m – temperature de desnaturação
- UE – União Europeia
- UV – Ultravioleta
- VIS – Visível

I COMPONENTE TEÓRICA

1.1 Introdução

Há já alguns milhares de anos que o ser humano melhora e seleciona espécies de plantas, tendo por base a biotecnologia convencional. Ainda hoje é realizada a recolha de plantas, o seu cruzamento e escolha das espécies com características de interesse. Não obstante, este tipo de manipulação era efetuado de um modo empírico, dado que não havia conhecimentos acerca do mecanismo molecular responsável por este aperfeiçoamento, e este poderia demorar décadas a surtir efeito (Chrispeels & Sadava, 2003). Ao longo das últimas duas décadas, muitos têm sido os estudos realizados no sentido de perceber estes mecanismos despoletando um forte avanço biotecnológico na área da Engenharia Genética, nomeadamente através da introdução dos organismos geneticamente modificados (OGM). Na Diretiva 2001/18/CE, OGM é definido como todo o organismo vivo (exceto o Homem) cuja constituição genética tenha sido alterada de forma a adquirir características que não ocorreriam por cruzamento ou recombinação natural, isto é, não ocorreriam espontaneamente. Há que salientar que quando se fala de OGM, geralmente associa-se a espécies vegetais, dado serem estas as principais espécies alvo da engenharia genética.

Foi a partir da década de 80 que se intensificou o desenvolvimento das técnicas de ADN recombinante (técnicas responsáveis pela manipulação genética), havendo, no final dos anos 90, a introdução de algumas variedades de espécies vegetais geneticamente modificadas (Mafra & Oliveira, 2005). Este grande avanço da ciência veio revolucionar a produção agrícola de determinadas espécies por lhes permitir resistirem a herbicidas, insetos e a condições adversas. Adicionalmente, iniciou-se a produção de culturas com qualidade nutricional melhorada e diferentes características organoléticas (Chrispeels & Sadava, 2003). Contudo, esta temática tem-se tornado bastante controversa devido, sobretudo, à avaliação da relação risco/benefício e até mesmo de questões éticas. Assim, grande parte da população a nível mundial continua pouco recetiva ao consumo de géneros alimentícios contendo OGM. De uma maneira geral, o conceito de OGM afasta-se do que é aceite como saudável ou natural para grande parte dos indivíduos. Cada vez mais o consumidor é exigente em relação aos géneros alimentícios que consome, encontrando-se particularmente preocupado com os efeitos nocivos para a saúde que possam advir da ingestão de determinados alimentos como os OGM. A população em geral tem-se ainda mostrado apreensiva com os efeitos ambientais que possam ser causados pelo cultivo de culturas transgênicas (Pelletier et al., 2006).

O impacto deste tema é moldado pela perceção social dos riscos, até porque muitas vezes

existem apenas suspeitas relativamente aos riscos (Trail *et al.*, 2004). Torna-se então urgente clarificar os conceitos relativos aos OGM para que os consumidores tenham capacidade de avaliar os riscos e os benefícios, podendo fazer uma escolha consciente. Assim, é desejável que os produtos GM ou seus derivados apresentem uma informação clara e concisa a nível da sua rotulagem, para que o consumidor saiba exatamente o que está a consumir e em que quantidade o está a fazer.

É de extrema importância a existência de um padrão de procedimentos que estipulem regras e que tenham em consideração todos os fatores que possam repercutir efeitos ao nível da segurança alimentar. Nos últimos anos, com a sua produção intensificada, a comercialização de alimentos GM tem-se revelado bastante controversa. De uma perspectiva científica, a segurança dos OGM poderá ter implicações para a saúde humana resultante da possível toxicidade ou alergenicidade dos produtos resultantes da inserção de ADN estranho, podendo ocorrer alterações, conhecidas ou não. Tal poderá provocar modificações no valor nutricional do alimento e até mesmo na sua capacidade alergénica, podendo esta última ser modificada pela desregulação ou alteração de todos os processos bioquímicos envolvidos (Pelletier *et al.*, 2006).

1.2 Cultivo de OGM a nível mundial

Segundo o ISAAA (The International Service for the Acquisition of Agri.biotech Applications) o cultivo de culturas transgénicas tem vindo a aumentar de forma acentuada desde 1996, o ano em que foi autorizada pela primeira vez a sua comercialização ou seus derivados destinados à alimentação. No ano de 2014, estas culturas atingiram já os 181,5 milhões de hectares cultivados, o que significa que aumentaram cerca de 100 vezes relativamente aos 1,7 milhões cultivados em 1996. São já 28 os países com plantação de culturas transgénicas, sendo que os Estados Unidos da América lideram a lista dos países que mais as cultivam, com uma área de 73,1 milhões, seguidos pelo Brasil com 42,2 milhões de hectares e na terceira posição a Argentina, com 24,3 milhões de hectares. Em Portugal foram plantados, em 2013, cerca de 8200 hectares de culturas GM (Agência Portuguesa do Ambiente, 2015). Tem-se verificado também o aumento do número de espécies alvo de manipulação genética, tais como a batata, a beterraba, a beringela, entre outros. No entanto, a soja continua a ser a cultura GM mais cultivada, representando cerca de 50% do total da área global cultivada, seguida pelo milho, algodão e colza. O total da área cultivada de outras espécies apenas

representa 1% das culturas transgênicas. É de salientar ainda que a soja GM representa atualmente cerca de 82% do total de soja total plantada (James, 2014).

Ao longo dos anos, as plantas transgênicas foram sendo desenvolvidas com foco sobretudo em melhoramentos agronômicos, tais como a tolerância a herbicidas, resistência a insetos e a combinação das duas características. Em todo o mundo, um total de 377 eventos de 27 espécies de plantas transgênicas foram aprovados para comercialização e/ou cultivo de alimentos (ISAAA, 2015). Na UE, 84 eventos receberam já aprovação, principalmente para a comercialização e utilização na alimentação humana e animal, tendo alguns já expirado ou estão em renovação (GMO Compass, 2015). Destes 84, 12 são de soja, 40 de milho e 11 de algodão. Por isso, várias plantas GM, que exibem uma panóplia de características (por exemplo, resistência a doenças e antibióticos, a tolerância a herbicidas), têm entrado direta ou indiretamente na alimentação humana (GMO Compass, 2015).

1.3 Transformação genética de plantas

A primeira técnica de transformação de plantas a ser desenvolvida foi efetuada por mediação da *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria gram negativa, flagelada, que pertence à família Rhizobiaceae. Esta bactéria possui um plasmídeo que induz a formação de tumores e tem a capacidade de transferir ADN estranho para as células de plantas, desde que esse ADN esteja localizado entre as regiões fronteiriças (polos ou sequências) que flanqueiam a região do T-DNA do plasmídeo (que é a porção que vai ser transferida). O plasmídeo possui ainda uma região *vir* (virulência) que não é transferida para as células vegetais, mas é fundamental para a separação do T-DNA do plasmídeo. Assim, esta bactéria consegue transferir os genes de interesse para as células vegetais (Canhoto, 2010).

Outra técnica de transformação genética de plantas consiste no bombardeamento de microprojéteis ou biolística. Esta baseia-se no revestimento de partículas de um metal inerte (ouro, paládio, platina, tungstênio) com o ADN de interesse e projetá-las para o interior dos tecidos a transformar. Na zona de impacto, um grande número de células morre, mas aquelas em que o ADN foi incorporado no núcleo e que sobrevivem conseguem regenerar plantas com a característica de interesse, desde que sujeitas a condições de cultura adequadas. Todo este processo é possível devido à totipotência das células vegetais, ou seja, a sua capacidade de se dividirem e originarem novas células. (Canhoto, 2010).

I.4 Riscos/benefícios dos OGM

Cada vez mais é justificado o recurso à manipulação genética de espécies vegetais na resolução de dificuldades específicas que se têm verificado na agricultura. Assim, estas alterações genéticas permitem criar resistência a pragas, tolerância a herbicidas e a condições de *stress* biótico e abiótico. Aparentemente, tornam-se favoráveis ao ambiente, já que em condições normais, se traduz numa menor utilização de ou inseticidas e, conseqüentemente, numa diminuição dos prejuízos que daí advêm. Contudo, as culturas tolerantes a herbicidas promovem o seu uso, não sendo por isso favoráveis ao ambiente. Por outro lado, com o aumento da produção, diminui o abandono das práticas agrícolas, é evitada a erosão dos solos, preservando o seu conteúdo (Batista & Oliveira, 2009). Estas características das culturas GM trazem, ainda que indiretamente, benefícios para os consumidores, já que este aumento da produção agrícola, provocado pelo progresso biotecnológico, viabiliza o aumento da capacidade de resposta de produção face à escassez de alimento e ao aumento populacional verificados atualmente (James, 2014).

Um benefício direto para os consumidores, é aquele que é provocado pela alteração genética com a finalidade de incrementar o seu valor nutricional. O arroz dourado que resultou do enriquecimento com pró-vitamina A e da sua biofortificação com compostos como ferro e zinco, foi desenvolvido com a finalidade de ser introduzido em países cuja população demonstra carência destes compostos (Beyer et al, 2002; Beyer, 2010). Contudo, este tipo de modificações ainda é muito limite.

No que diz respeito aos riscos que estes organismos representam, e como acontece com todos os riscos associados à segurança alimentar, as crianças, os idosos e doentes crónicos são os grupos onde se verifica maior vulnerabilidade uma vez que o seu estado de saúde já é naturalmente mais debilitado ou mais sensível. No caso dos géneros alimentícios proveniente de plantas GM, mesmo não consumindo o alimento contendo a proteína à qual determinado indivíduo é alérgico, há a possibilidade de desenvolvimento de reação alérgica, uma vez que pode ter sido inserido algum gene que produza uma nova proteína capaz de induzir uma resposta alérgica

A nível ambiental, a introdução de resistência a herbicidas e/ou inseticidas pelo cultivo de OGM pode traduzir-se num risco a médio/longo prazo já que as pragas e ervas daninhas podem desenvolver mecanismos de resistência aos herbicidas, fazendo com que este tipo de compostos venham a ser utilizados em larga escala e traduzir-se num efeito contrário ao inicialmente previsto. Este facto leva a uma potencial acumulação de compostos químicos,

que entram na composição de herbicidas e/ou inseticidas, nos solos e lençóis freáticos, afetando também o meio aquático (Shrestha *et al.*, 2008).

Pode ainda ocorrer a transferência horizontal de genes, alterando espécies não-alvo, sendo que esta transferência poderá ocorrer naturalmente, afetando assim a biodiversidade a longo prazo (Chrispeels & Sadava, 2003). Com toda esta dualidade risco/benefício tornou-se premente uma legislação que se foque na proteção e qualidade da vida humana e animal, mas também de todo o meio envolvente (Tabela I) (Estorninho, 2008).

1.5 Legislação

A globalização económica, que pressupõe um incremento do comércio internacional, bem como o crescente intercâmbio cultural, pode rapidamente originar a propagação de riscos de saúde e sanitários à escala mundial (Estorninho, 2008). Torna-se, assim, premente uma legislação que vise minimizar estes riscos e aumentar a segurança alimentar, nomeadamente, no que diz respeito aos OGM. Na União Europeia existe legislação geral que visa a segurança alimentar também legislação específica para OGM.

Toda a informação legislativa e regulamentar que regem a segurança alimentar na Europa (Tabela I) abrange todas as fases: produção, transformação e distribuição, ou seja “do prado ao prato”. (Regulamento (CE) N° 178/2002). A rotulagem alimentar também está legislada e baseia-se no Regulamento (CE) N° 1169/2011, o qual se encontra atualmente em fase de implementação.

Na UE, os dois principais instrumentos legais para avaliação de segurança dos OGM são a Diretiva 2001/18/CE, que fornece os princípios que regulam a libertação deliberada de OGM no ambiente, e o Regulamento (CE) N.º 1829/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, que fortalece e expande as regras para a avaliação de segurança dos OGM, fornecendo um procedimento comunitário único para a nova autorização de todos os géneros alimentícios e alimentos para animais derivados de OGM. A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESAs) tem um papel central no aconselhamento científico e avaliação do risco independente de OGM, enquanto o que diz respeito à autorização de produtos, inspeção e controlo de tomada de decisão são da responsabilidade dos gestores de risco dos Estados-Membros e de Comissão Europeia.

A Diretiva 2001/18/CE coloca em prática um processo de aprovação passo-a-passo efetuado de uma avaliação caso-a-caso do risco para a saúde humana e o ambiente antes de qualquer OGM poder ser libertados no ambiente, ou colocado no mercado como, ou em, produtos

derivados. A diretiva introduz a obrigação de propor um plano de monitoramento, a fim de localizar e identificar quaisquer efeitos diretos ou indiretos, imediatos, diferidos ou imprevistos na saúde humana ou no ambiente, provenientes dos OGM em produtos depois de terem sido colocados no mercado. De acordo com o Regulamento (CE) N.º 1829/2003, géneros alimentícios e alimentos para animais GM só devem ser apenas autorizados para colocação no mercado depois de uma avaliação científica de qualquer risco, que possam apresentar para a saúde humana e animal e, conforme o caso, para o meio ambiente. O regulamento exige que os alimentos não devem: (i) ter efeitos adversos na saúde humana, na saúde animal ou e no ambiente; (ii) induzir em erro o consumidor/utilizador; (iii) diferir dos alimentos/alimentos para animais que estejam destinados a substituir, de tal forma que o seu consumo normal se torne nutricionalmente desvantajoso para o consumidor/animais. A rotulagem é necessária quando o conteúdo de qualquer ingrediente autorizado GM ultrapassa 0,9% do produto alimentar ou alimentos para animais; neste caso, o termo "geneticamente modificado" deve figurar na lista de ingredientes imediatamente após o ingrediente relevante. Abaixo deste limiar, a presença de material GM é considerada acidental ou tecnicamente inevitável, e o produto pode ser vendido sem rotulagem. Para os ingredientes não autorizadas GM, o limiar é fixado em 0,5%, desde que a fonte de OGM tenha sido pré-avaliada, e que um método de deteção apropriado para a sua presença esteja disponível.

Um dos fatores que contribui para a minimização dos riscos a nível da segurança alimentar é a rastreabilidade, já que, em caso de ocorrência de qualquer tipo de problema, torna a descoberta da sua origem fácil e rápida, para que possam ser tomadas medidas eficazes. Torna-se então crucial e obrigatório que todos os operadores assegurem a transmissão das informações sobre a composição do produto em termos de OGM aos operadores que os recebem, garantindo assim que, na eventualidade de ser necessário, facilmente se chegue à origem do produto (Regulamento (CE) N.º 1830/2003).

Todos os anos a Direcção-Geral da Comissão Europeia para a Saúde e Consumidores efetua um relatório anual em que resume todos os alertas registados em termos de segurança alimentar, que indicam qual o país produtor ou detentor do género alimentício em causa, qual o género alimentício que originou o alerta entre outros dados. Este relatório – Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) – torna-se muito vantajoso uma vez que permite um acesso rápido a este tipo de informação por parte dos estados-membros. Esta iniciativa permite ainda que, anualmente, sejam verificados quais os géneros alimentícios mais suscetíveis de apresentarem riscos e promover ações ao nível desses produtos. Este relatório é geral e faz referência a todos os riscos relacionados com a segurança alimentar,

incluindo os alertas devido a géneros alimentícios GM ou derivados. A lei prevê ainda que cada estado-membro deverá realizar ações de controlo, inspeção e análise de géneros alimentícios ou alimentos para animais GM, de forma a garantir que só os eventos e os produtos autorizados se encontrem disponíveis no mercado (Regulamento (CE) N° 1830/2003; RASFF, 2014).

Tabela I Resumo da legislação Portuguesa e da União Europeia.

	Diploma	Objeto
LEGISLAÇÃO PORTUGUESA	<u>Decreto-Lei n° 154/2004</u>	"Estabelece o regime geral do Catálogo Nacional de Variedades de Espécies Agrícolas e de Espécies Hortícolas, bem como os princípios e as condições que estas variedades, incluindo as geneticamente modificadas e os recursos genéticos vegetais de reconhecido interesse, devem observar para que a certificação das suas sementes e propágulos possa ter lugar, bem como a respetiva comercialização".
	<u>Decreto-Lei n° 168/2004</u>	"Visa assegurar a execução e garantir o cumprimento, na ordem jurídica interna, das obrigações decorrentes para o Estado Português do Regulamento (CE) n° 1830/2003, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro, que estabelece regras relativas à rastreabilidade e rotulagem".
	<u>Decreto-Lei n° 102/2005</u>	"Visa assegurar a execução e garantir o cumprimento, no ordenamento jurídico nacional, das obrigações decorrentes para o Estado Português do Regulamento (CE) n° 1829/2003, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro, relativo a géneros alimentícios e alimentos para animais geneticamente modificados".
	<u>Decreto-Lei n° 160/2005</u>	"Regula o cultivo de variedades geneticamente modificadas, visando assegurar a sua coexistência com culturas convencionais e com o modo de produção biológico".
	<u>Portaria n° 904/2006</u>	"Estabelece as condições e o procedimento para o estabelecimento de zonas livres de cultivo de variedades geneticamente modificadas".
	<u>Decreto-Lei n° 387/2007</u>	Cria o Fundo de Compensação destinado a suportar eventuais danos, de natureza económica, derivados da contaminação acidental do cultivo de variedades geneticamente modificadas.
LEGISLAÇÃO DA UE	<u>Diretiva 2001/18/CE</u>	"Relativa à libertação deliberada no ambiente de organismos geneticamente modificados".
	<u>Regulamento (CE) n° 178/2002</u>	"Determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios".
	<u>Regulamento (CE) n° 1829/2003</u>	"Relativo a géneros alimentícios e alimentos para animais geneticamente modificados".
	<u>Regulamento (CE) n° 1830/2003</u>	"Relativo à rastreabilidade e rotulagem de organismos geneticamente modificados e à rastreabilidade dos géneros alimentícios e alimentos para animais produzidos a partir de organismos geneticamente modificados e que altera a Diretiva 2001/18/CE".

I.6 Métodos de deteção e quantificação de OGM

Um alimento proveniente de um OGM deverá ser sujeito a todo um processo exaustivo de avaliação dos seus efeitos, a todos os níveis (saúde e bem-estar humano e animal, proteção do ambiente e biodiversidade, por exemplo), só podendo ser comercializado na UE após ter sido aprovado através de um conjunto de procedimentos de avaliação detalhados. Estes baseiam-se na avaliação científica dos riscos para a saúde humana e o ambiente (Pansiot *et al.*, 2011).

De modo a assegurar que o nível de OGM em ingredientes alimentares e géneros alimentícios se processe de acordo com a legislação em vigor, é necessário proceder a controlos restritos por parte dos organismos responsáveis. No caso particular da UE, onde o Regulamento (CE) N.º 1829/2003 torna obrigatória a rotulagem da presença accidental ou tecnicamente inevitável de OGM na proporção acima de 0,9%, o desenvolvimento de técnicas sensíveis e quantitativas tornou-se essencial. Assim, as técnicas analíticas cada vez mais sensíveis e de aplicação rápida são fundamentais, tanto nos países onde a rotulagem é obrigatória, como naqueles que querem exportar para países com restrições (Mafra *et al.*, 2008a).

As técnicas (qualitativas e quantitativas) de deteção e quantificação de OGM assentam sobretudo em métodos baseados na análise de proteínas ou de ADN. Os métodos baseados na deteção de ADN consistem sobretudo na utilização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) que, hoje em dia, é largamente aplicada na avaliação da autenticidade e segurança de alimentos, destacando-se na identificação de espécies, na deteção de alergénios, de microrganismos patogénicos, para além dos OGM. Recentemente, os ácidos nucleicos têm-se assumido como as moléculas de eleição, no que diz respeito à deteção e identificação de componentes alimentares, devido principalmente à estabilidade do ADN quando comparada com a das proteínas e ainda devido à sua presença na maior parte dos tecidos biológicos (Mafra *et al.*, 2008a).

Os métodos utilizados para analisar OGM podem ser baseados em tecnologias distintas e a aplicação de cada um depende do tipo de análise ou estudo que se pretende efetuar. Relativamente aos alimentos, quando se pretende verificar o cumprimento da legislação em vigor, os laboratórios autorizados têm que conseguir determinar se se trata de um evento autorizado ou não, e ainda, quando autorizados, a percentagem presente no alimento, seguindo o esquema geral apresentado na Figura I.

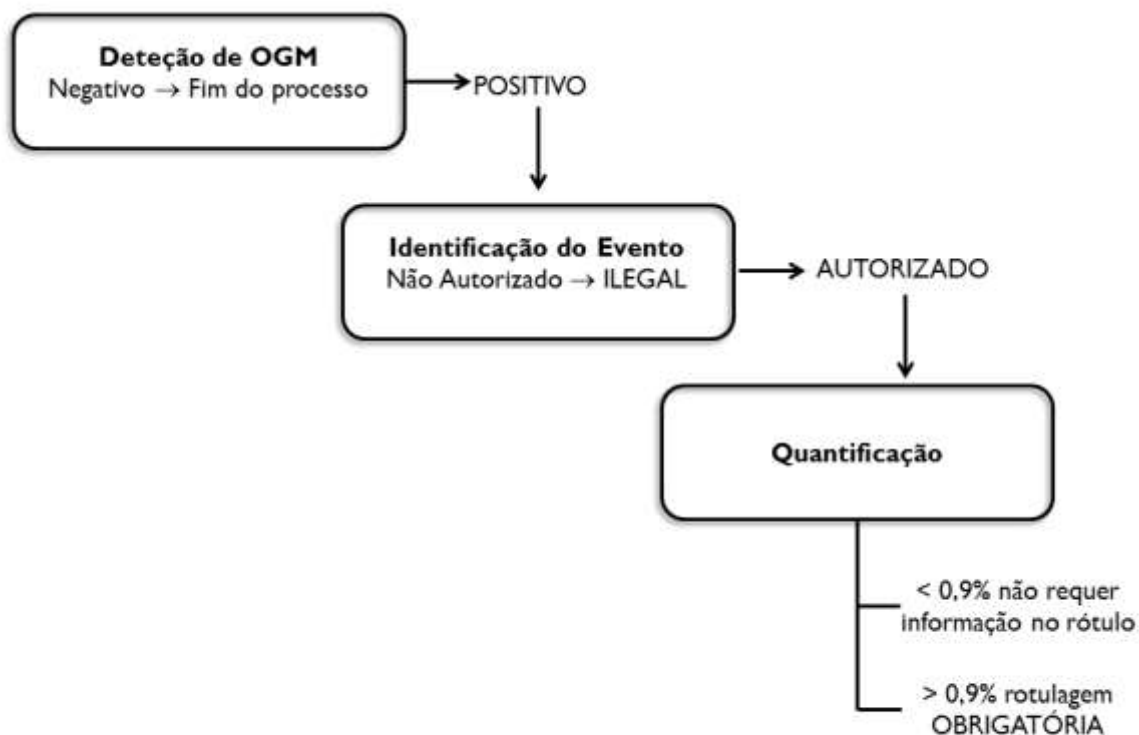


Figura 1 Esquema indicativo dos procedimentos laboratoriais na análise de OGM para verificação da conformidade com a legislação.

Na Tabela 2 estão compiladas as principais características e diferenças entre os métodos de análise de OGM baseados na presença de proteínas e na presença de ADN.

Tabela 2 Principais diferenças entre métodos baseados na análise de proteínas e na análise de ADN (adaptada de Giovannini *et al.*, 2002).

Características	Métodos baseados na análise de proteínas (ELISA/Tiras fluxo lateral)	Métodos baseados na análise de ADN (PCR)
Sensibilidade	Média	Alta
Sensibilidade a contaminantes	Baixa	Alta
Complexidade	Média/Baixa	Alta
Rapidez	Média/Alta	Média
Marcadores Universais	Não	Sim
Disponibilidade de marcadores	Baixa (anticorpos)	Alta
Quantificação	Sim/Não	Sim/Não
Deteção em matrizes complexas	Baixa	Alta

1.6.1 Métodos baseados na análise de proteínas

A análise de proteínas específicas só é possível porque, geralmente, elas possuem uma característica única, tal como uma propriedade física ou uma enzima (Ahmed, 2004; Natarajan *et al.*, 2013). Embora as proteínas também possam ser detetadas com recurso a métodos físico-químicos, as técnicas mais utilizadas são as que se fundamentam em princípios imunológicos, como por exemplo ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), dispositivos de fluxo lateral (LFD – Lateral Flow Devices) ou *Western Blot*. Os anticorpos utilizados podem ser monoclonais (altamente específicos) ou policlonais, que geralmente são mais sensíveis, sendo escolhidos consoante as quantidades necessárias e a especificidade da deteção, isto é, se se utilizam anticorpos para proteínas na sua totalidade ou para péptidos específicos. Tem ainda que ser levado em conta a sua aplicação e o tempo disponível para a análise (Mafra & Oliveira, 2005).

Neste tipo de ensaios, as proteínas são reconhecidas por anticorpos específicos e esta reação anticorpo-antigénio, é normalmente detetada por métodos colorimétricos. No entanto, para realizar estes ensaios é obrigatório o conhecimento das proteínas alvo. Nos OGM, as proteínas expressas não estão incluídas na espécie original. Este facto faz com que seja necessário o conhecimento prévio dessas proteínas, o que por si só já se traduz numa desvantagem destes métodos. Outra desvantagem reside no facto destes analitos alvo poderem não ser expressos em quantidades detetáveis pelos métodos imunológicos. Há ainda outro fator que torna estes métodos mais vulneráveis, que é a menor estabilidade térmica das proteínas, o que dificulta e pode até impossibilitar a sua análise em alimentos muito processados. Contudo, tratando-se de alimentos com baixo nível de processamento e quando são perfeitamente conhecidas as proteínas alvo, estes ensaios podem tornar-se muito úteis por possibilitarem testes relativamente rápidos, podendo mesmo ser utilizados em campo (LFD).

1.6.1.1 ELISA

Os ensaios ELISA são testes baseados na reação anticorpo-antigénio, onde ocorre uma alteração mensurável, que, em geral, se deve a uma mudança de cor. Estes testes podem ser realizados em placa (ou tiras) de micropoços ou em tubos revestidos, podendo variar entre ELISA competitiva, no qual existe uma competição entre o anticorpo primário e o analito para o local de ligação; e ELISA não competitiva direta, em que há deteção de anticorpos, ou indireta em que ocorre a deteção do antigénio (analito). O ensaio ELISA mais utilizado na análise de OGM é o tipo *sandwich*, no qual, conforme se pode verificar na figura 2, as placas

possuem já um anticorpo específico imobilizado na sua superfície e ao adicionar a amostra e anticorpos acoplados com uma enzima, é incubada e, após a lavagem, somente os complexos anticorpo-antigênio-anticorpo marcado permanecem ligados à placa, que quando entram em contato com o substrato da enzima acoplada há uma alteração de cor, o que vai permitir a detecção desta reação. Esta mudança é mensurada espectrofotometricamente (Mafra & Oliveira, 2005).

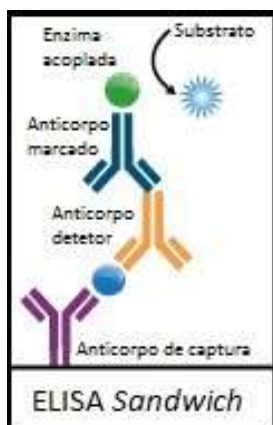


Figura 2 Elisa tipo *sandwich* (adaptada de <http://www.abnova.com>).

1.6.1.2 Dispositivos com tiras de fluxo lateral

Estes dispositivos possuem 2 anticorpos específicos para o analito alvo (proteína expressa pelo OGM) e têm associada uma solução corada, numa tira de nitrocelulose. Ao entrar em contato com a amostra em análise, o anticorpo marcado é solubilizado, ligando-se à proteína alvo (antigênio) e quando este complexo antígeno-anticorpo migra através da tira, passa através do local de ligação do segundo anticorpo (marcado). Se a amostra for positiva dá-se a ligação deste segundo anticorpo ao complexo anteriormente formado e surge uma primeira banda corada, seguida de uma segunda banda que prova que houve uma migração correta através da tira. Se a amostra for negativa para a presença do OGM, surge apenas uma banda (a segunda).

Este tipo de testes são ideais para detectar a presença de OGM de forma rápida e sem necessidade de equipamento e segundo Mafra & Oliveira (2005), podem mesmo estabelecer um limite semi-quantitativo, já que a análise de material de referência para a soja RR demonstrou ser possível a detecção de 0,1% deste evento.

1.6.1.3 Western Blot

Esta é uma técnica qualitativa com elevada especificidade, que fornece resultados do género presente/ausente. Trata-se de um método que permite a separação e deteção de proteínas. A separação, geralmente, é feita por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), sendo as proteínas depois transferidas para uma membrana, mantendo o mesmo perfil eletroforético que tinha no gel. Posteriormente as membranas são incubadas com um anticorpo, que ao reconhecer as proteínas específicas, ligam-se às mesmas, formando complexos antígeno-anticorpo. Finalmente para a deteção, efetua-se uma incubação com um anticorpo secundário que se vai ligar ao anticorpo detetor. Este anticorpo secundário tem a particularidade de estar conjugado com uma enzima, que ao reagir com o seu substrato provoca uma alteração de cor e é esta alteração que permite a sua deteção (Videira, 2011).

O *western blot* tem a vantagem de ser menos suscetível de interferência da matriz do alimento, comparativamente com o teste ELISA, mas ambos podem ser aplicados na deteção de OGM. Esta técnica, não só pelo que tempo que demora, mas também pelo elevado número de procedimentos que envolve, é geralmente mais utilizada em estudos e investigação do que em ensaios de rotina (Mafra & Oliveira, 2005).

1.6.2 Métodos baseados na análise de ADN

Todos os organismos vivos (bactérias, animais e plantas) são constituídos por células que possuem ADN, molécula constituída por uma cadeia dupla em forma de hélice e que codifica toda a informação genética da célula, contendo a informação genética que passa de geração em geração e determinando as características inerentes à espécie (Griffiths *et al.*, 1998).

Assim o ADN possui toda a informação genética que permite a reprodução de um organismo na sua totalidade, fazendo com que indivíduos da mesma espécie apresentem características semelhantes. Assim, torna-se compreensível que técnicas que se baseiem na análise de ADN demonstrem vantagens relativamente a outras descritas na literatura. Os métodos baseados na análise de ADN estão normalmente associados à PCR, que é uma técnica que permite a amplificação fácil, rápida e seletiva de fragmentos específicos, apresentando ainda um elevado nível de versatilidade dado que permite a amplificação do ADN em diferentes tipos de matrizes (Natonek-Wiśniewska *et al.*, 2013). Estes métodos tiram partido da elevada estabilidade térmica da molécula de ADN quando comparada com a das proteínas, o que os torna muito utilizados na análise de alimentos com elevado grau de processamento. Contudo, apesar do potencial destas técnicas na análise de ADN, existem

uma série de fatores que podem dificultar a avaliação da presença de material GM (Mafra & Oliveira, 2005). Por exemplo, sequências alvo com tamanho superior a 300 pb são mais suscetíveis de sofrerem degradação durante o processamento de alimentos, o que pode originar resultados falsos negativos (Engel *et al.*, 2006). Apesar do custo e da necessidade de pessoal com formação específica para executar estas técnicas, as entidades reguladoras, na verificação do cumprimento da lei, e até mesmo a indústria alimentar recorrem à aplicação destes métodos, dado apresentarem elevada sensibilidade e especificidade (Holst-Jensen, 2009).

1.6.2.1 Extração e isolamento de ADN

É fundamental que os extratos de ADN a analisar sejam de qualidade adequada, para que seja viável e fiável a sua análise por PCR. A quantidade e qualidade do ADN extraído deverá ser elevada para que a amplificação ocorra com eficiência. A PCR pode ainda ser afetada pela presença de inibidores no alimento, como polissacarídeos, proteínas, polifenóis e lípidos, ou até mesmo de inibidores provenientes dos reagentes utilizados pelo próprio método de isolamento, tais como o brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), SDS (dodecilsulfato de sódio) ou solventes orgânicos (como clorofórmio, etanol, isopropanol). É então crucial a escolha do método de extração adequado para o tipo de matriz em análise, para que haja capacidade de remover significativamente a presença de inibidores da reação (Di Pinto *et al.*, 2007; Mafra *et al.*, 2008b; Schubert, 2010). A extração do ADN requer a lise celular, a inativação das nucleases celulares e a separação dos contaminantes (Mafra *et al.*, 2008b; Gryson, 2010). Hoje em dia, existem já disponíveis no mercado diversos *kits* comerciais para extração de ADN em alimentos que possibilitam o seu isolamento com elevada eficiência, de matrizes com elevado grau de complexidade, baseados, por exemplo, na ligação do ADN a resinas, a partículas magnéticas ou membranas de sílica, tais como os kits Nucleospin Food ou Wizard (Promega) (Marmioli *et al.*, 2008)

1.6.2.2 PCR qualitativa

A utilização da PCR qualitativa na análise de OGM em alimentos permite avaliar a presença de material GM a partir de ADN extraído do alimento, usando *primers* específicos para a sequência alvo. Requer também a adição de um tampão para proporcionar um meio ótimo para o funcionamento da enzima e cloreto de magnésio ($MgCl_2$), que é um cofator da enzima. Esta é uma técnica que permite a amplificação rápida de vários milhares de cópias do ADN de interesse, mesmo a partir de uma pequena quantidade de amostra (Videira, 2011).

Numa fase inicial, a PCR promove a separação da dupla cadeia de ADN em duas cadeias simples, através da elevação da temperatura, geralmente a -95°C (desnaturação). Neste ponto, a temperatura decresce gradualmente, atingindo a temperatura de hibridação (*annealing*) dos *primers* utilizados na reação, normalmente entre os $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$, promovendo-se a sua ligação nas extremidades 3' das cadeias simples. Finalmente, a temperatura é de novo aumentada, aproximadamente até aos 72°C (temperatura ótima de atuação da enzima *Taq* polimerase), dando origem à extensão, fase em que ocorre replicação da cadeia de ADN por ação de uma polimerase do ADN termorresistente (normalmente utiliza-se a *Taq* polimerase que é uma enzima termo estável recombinante da bactéria *Thermus aquaticus*, que tem a vantagem de resistir à temperatura de desnaturação do ADN). Esta enzima sintetiza exclusivamente no sentido $5' \rightarrow 3'$. Em suma, o processo de síntese é iniciado numa zona com cadeia dupla, incorporando os nucleótidos complementares à sequência alvo (*primers*) e utilizando as dNTP em solução, que vão permitir a extensão, que se inicia no extremo 3' do *primer*, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples (Figura 3). Estas três etapas constituem um ciclo da PCR, sendo este repetido *n* vezes, aumentando exponencialmente o número de cópias. No final, obtém-se 2^n cópias do fragmento de ADN (Figura 3). A confirmação da amplificação é efetuada através de uma eletroforese em gel de agarose onde, com a ajuda de um marcador de massa molecular do ADN concordante com o tamanho do fragmento em questão, consegue-se visualizar bandas na região correspondente, confirmando-se a ocorrência da sua amplificação através da visualização de bandas específicas da sequência

É importante ainda referir que esta é uma técnica que permite uma análise do tipo presente/ausente, dado que a eficiência da amplificação não é um parâmetro constante ao longo dos ciclos, não sendo possível quantificar o conteúdo GM.

Ao escolher as sequências de ADN a ser amplificado para deteção de OGM, vários alvos poderão ser considerados, dependendo do nível requerido de especificidade. Uma inserção típica de um gene (construção genética) num OGM é composta por, pelo menos, 3 elementos: o elemento promotor, funcionando como um sinal de partida, o gene de interesse e o elemento terminador, que funciona como um sinal de paragem para regulação da expressão do gene (Figura 4). Além disso, vários outros elementos podem estar presentes numa construção genética, tais como genes que conferem resistência a antibióticos. Por conseguinte, diferentes tipos de elementos genéticos podem ser alvo nos ensaios de OGM (Mafra, 2011). As sequências menos específicas na deteção de OGM são as de rastreio – estão geralmente relacionadas com o promotor e/ou terminador, servindo para uma primeira análise (*screening*). Com a deteção de um gene específico responsável pela

característica de interesse aumenta-se o nível de especificidade. Pode-se aumentar ainda mais a especificidade, tentando detectar sequências específicas da construção e que se encontram entre elementos adjacentes, como por exemplo o terminador e o gene de interesse. Mas sem dúvida que a maior especificidade é quando se amplificam sequências específicas do evento e que por isso se encontram na junção entre o gene inserido e o hospedeiro, sendo esta junção única para cada evento GM (Holst-Jensen *et al.*, 2003; Shrestha *et al.*, 2008).

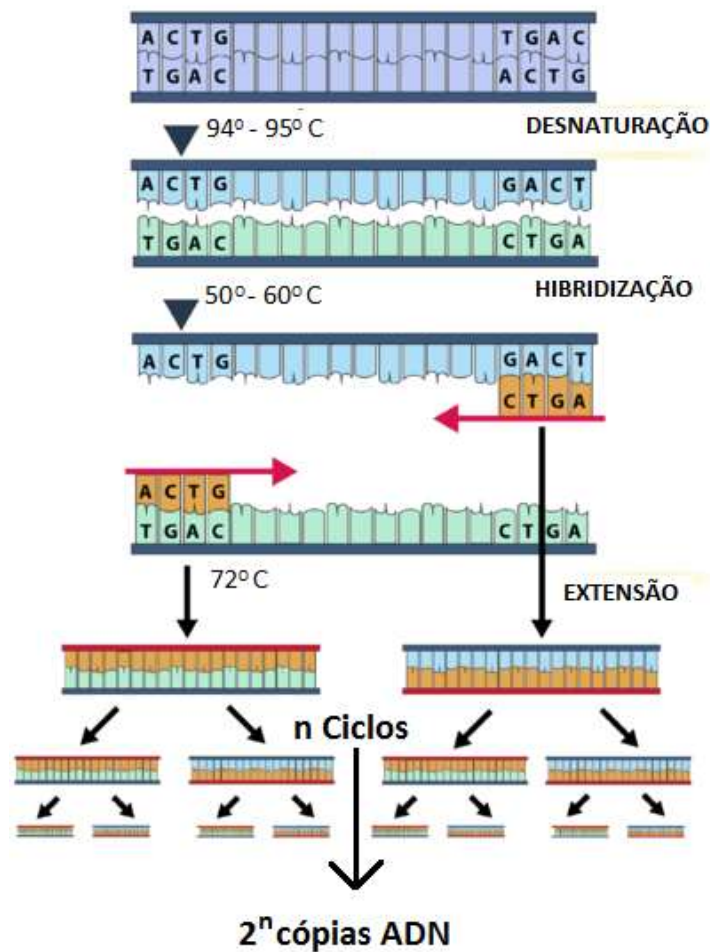


Figura 3 Reação em cadeia da polimerase (adaptada de <http://oceanexplorer.noaa.gov>).

No caso de alimentos provenientes de matrizes muito processadas, como os óleos refinados, recomenda-se que as sequências alvo a amplificar sejam de pequeno tamanho (~100 pb) (Costa *et al.*, 2010). Ainda na escolha dessa sequência, deve ter-se em consideração a sua composição em termos de Guanina e Citosina (G e C), dado que, estas bases são termicamente mais estáveis e por esse motivo podem influenciar a degradação/estabilidade do ADN (Gryson, 2007).

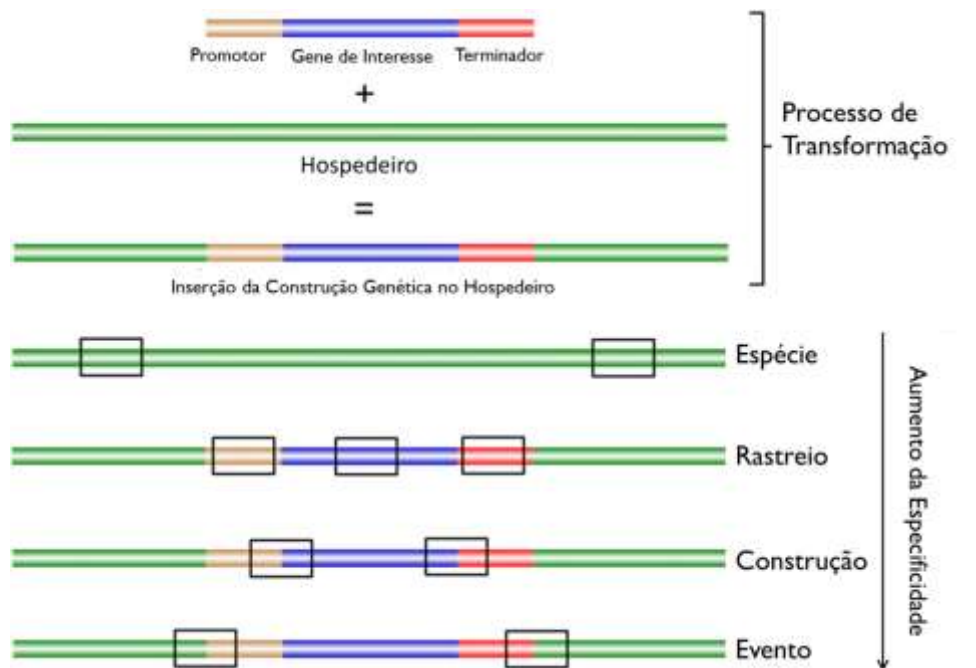


Figura 4 Exemplo de construção de um evento GM (adaptada de Holst-Jensen *et al.*, 2012).

Dos métodos baseados na técnica de PCR mais utilizados na detecção de OGM, destacam-se a PCR multiplex, a eletroforese capilar, os biossensores, os *microarrays* e PCR em tempo real (Mafrá, 2011). Para responder ao desafio da área crescente de cultivo de OGM e número de eventos autorizados, vários ensaios em multiplex têm sido desenvolvidos permitindo a detecção simultânea de múltiplos alvos num á ensaio. Na técnica de PCR em multiplex, vários pares de primers são usados na mesma reação para permitir a amplificação simultânea de várias sequências numa só reação (Hernandez *et al.*, 2005; Forte *et al.*, 2005) A detecção de OGM por eletroforese capilar via fluorescência induzida por laser (CGE-LIF) representa uma abordagem de detecção muito sensível e de rápida separação adequada para a automatização. Permite distinguir vários fragmentos pelo tamanho através do uso de *primers* marcados ou de corantes que se intercalam no ADN. A maior sensibilidade e resolução de CGE-LIF em comparação com electroforese em gel de agarose foi já demonstrada, sendo uma ferramenta útil para a optimização de amplificações de PCR multiplex (García-Cañas *et al.*, 2004c).

1.6.2.3 Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos capazes de converter um processo biológico num sinal mensurável. Os biossensores de ADN, são designados por Genossensores e são

dispositivos em que o processo biológico reconhecido é a reação de hibridização, por intermédio de sondas (oligonucleótidos sintéticos) cujas sequências são complementares à sequência de ADN de interesse (alvo). Estes dispositivos possuem uma elevada seletividade, devido à elevada especificidade do emparelhamento de bases entre sequências complementares, mesmo na presença de desemparelhamentos (Manzanares-Palenzuela *et al.*, 2015).

A combinação de reações de amplificação e biossensores aplicados na detecção de OGM é baseada em transdutores eletroquímicos, piezoelétricos (*quartz-crystal microbalance*) e óticos (SPR - *Surface Plasmon Resonance*) (Mafra, 2011). Os sistemas SPR são biossensores que, ao reconhecerem o alvo, induzem uma alteração no índice de refração na interface metal/líquido, e essa alteração da ressonância, pode ser medida através de métodos óticos. A hibridização do ADN alvo com a sonda imobilizada provoca uma alteração do índice de refração que está linearmente relacionada com a massa de ADN hibridizado. Os biossensores de cristais de quartzo piezoelétricos são dispositivos analíticos baseados na detecção do aumento da massa devido à hibridização na superfície do sensor, o que leva a um decréscimo da frequência de ressonância. Já o princípio de um biossensor eletroquímico baseia-se na reação de oxidação-redução que ocorre na superfície do eléctrodo de trabalho, o qual é submetido a um padrão pré-definido de potencial fixo ou variável. A variação nos fluxos de electrões leva à geração de um sinal electroquímico, que é medido pelo detector eletroquímico (Mafra, 2011; Manzanares-Palenzuela *et al.*, 2015).

Os *microarrays* ou chips de ADN são técnicas que consistem na montagem de vários biossensores ADN. Estes dispositivos possuem sondas de captura, específicas para o analito, imobilizadas à sua superfície. A detecção dos alvos é realizada através da hibridização das sondas após a pré-amplificação desses fragmentos alvo por PCR multiplex. Em termos de sensibilidade e reprodutibilidade, estes ensaios podem ser comparados às técnicas de PCR qualitativa, mas até agora não há referência na literatura de alguma abordagem relativamente à determinação da proporção de OGM em amostras através do acoplamento dos *microarrays* com PCR multiplex (Manzanares-Palenzuela *et al.*, 2015).

1.6.2.4 PCR quantitativa

De modo a verificar o cumprimento da legislação, é insuficiente apenas proceder à detecção de OGM, pois uma vez confirmada a presença de um evento é necessário determinar a sua proporção porque a legislação obriga à rotulagem para valores acima dos 0,9%.

A primeira PCR quantitativa a ser desenvolvida foi a PCR quantitativa competitiva (QC-PCR). Esta baseia-se na coamplificação competitiva de uma amostra de ADN padrão (cuja concentração é conhecida) e de uma amostra de ADN alvo (específico do evento) na mesma reação. A QC-PCR, apesar de ser um método sensível, robusto e aplicável a análises de rotina, torna-se uma técnica bastante dispendiosa, que necessita de padrões competidores específicos, sendo frequente a contaminação da amostra devido à excessiva manipulação. A fiabilidade dos resultados da quantificação por este método depende muito da técnica utilizada para detetar os produtos da amplificação (Conceição *et al.*, 2006). O procedimento usual consiste em separar os produtos da PCR através de eletroforese em gel de agarose e quantificar os fragmentos de ADN obtidos com um *software* de análise de imagem especializado. Esse procedimento não é de fácil reprodução, requer grandes quantidades de amostra e não permite resultados de uma forma rápida. A sensibilidade da QC-PCR é de aproximadamente 0,1 a 2% de OGM (Rudi *et al.*, 2003; Garcia-Cañas *et al.*, 2004b,c).

A técnica de PCR em tempo real consiste na monitorização da amplificação em tempo real ao longo dos vários ciclos. Esta monitorização é possível devido ao acoplamento com um sistema de emissão de um sinal de fluorescência, que, quando é emitido, é diretamente proporcional à quantidade de produto formado ao longo de cada ciclo. Este sinal de fluorescência deve-se à utilização de dois tipos de abordagens: agentes corantes que se vão intercalar no ADN de cadeia dupla e nessa altura emitem um sinal máximo de fluorescência; sondas específicas marcadas com um fluoróforo. A forma mais simples, comum e económica de efetuar PCR em tempo real consiste na utilização do corante universal SYBR Green que se intercala no ADN de cadeia dupla ao longo da amplificação. Apesar de ser um corante pouco específico, este método permite o cálculo da temperatura de *melting* (T_m) do fragmento alvo e a sua diferenciação de outros fragmentos de ADN de cadeia dupla, como por exemplo os dímeros de *primers*, que também emitem fluorescência, mas com diferentes T_m . Se se pretender aumentar a especificidade da reação, utiliza-se uma sonda marcada com um fluoróforo, como as sondas de hidrólise do tipo TaqMan. Esta sonda é constituída por um oligonucleótido, um grupo fluoróforo e um grupo anulador de fluorescência (*quencher*), a qual irá hibridar com a sequência alvo na região entre os *primers* (Mafra e Oliveira, 2005). Para além das sondas de hidrólise (TaqMan™), existem também as sondas de hidridação ou sondas FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) e as sondas de interação específica (Molecular Beacons™ e Scorpions™) (Mafra & Oliveira, 2005) (Figura 5).

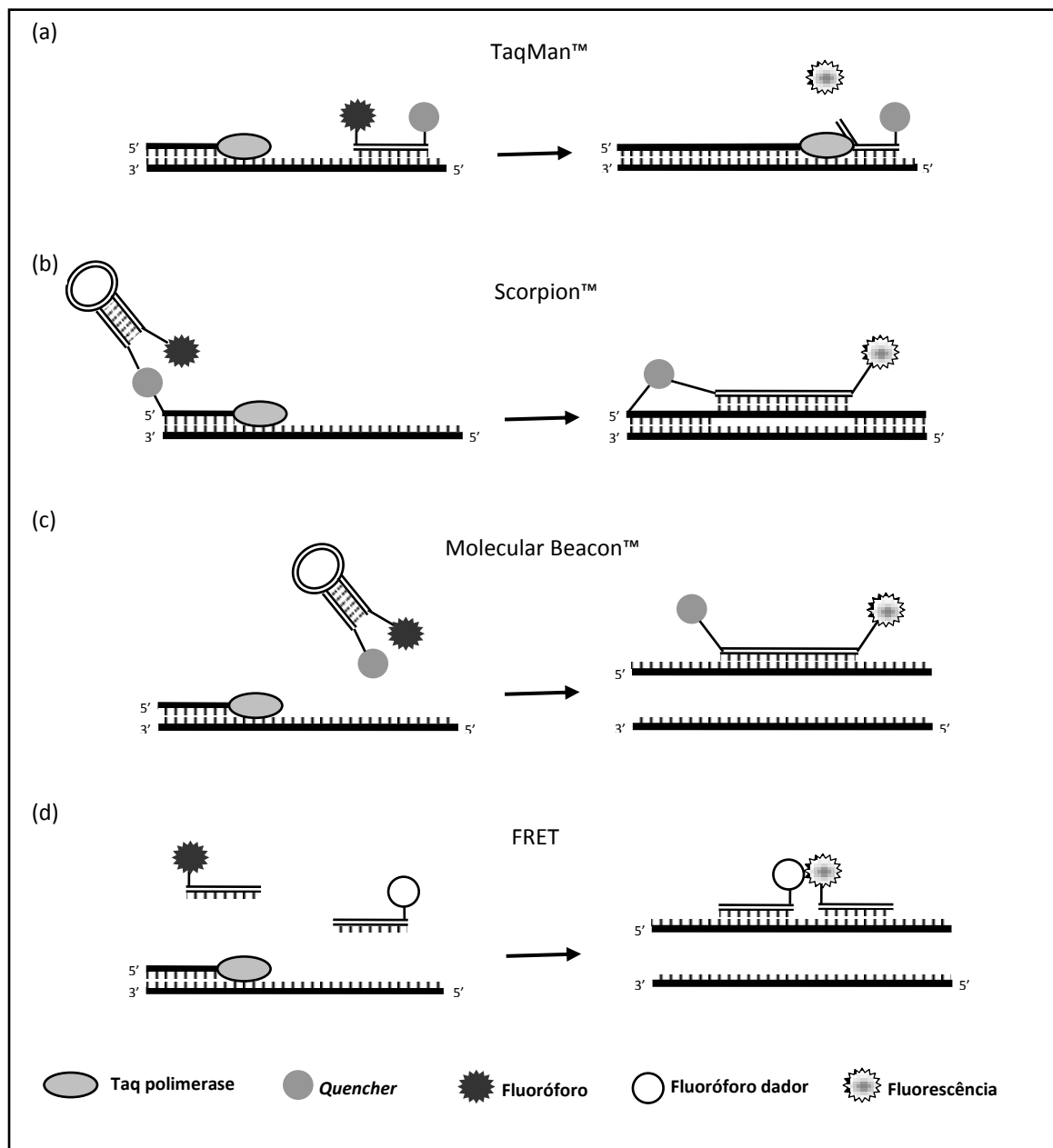


Figura 5 Representação esquemática do mecanismo dos diferentes tipos de sondas específicas de seqüências utilizadas na indução de emissão de fluorescência por PCR em tempo real. (a) Sondas TaqMan™; (b) Primers Scorpions™; (c) Molecular Beacons™ e (d) Tecnologia FRET (Mafra & Oliveira, 2005).

Ao número de ciclos da reação necessários para emissão de um sinal de fluorescência estatisticamente acima do nível de ruído designa-se por *Cycle Threshold* (Ct). Se a eficiência da reação for constante, este valor é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade de ADN (Arya *et al.*, 2005; Mafra & Oliveira, 2005). A cinética da reação permite distinguir 3 fases distintas (Figura 6). Uma primeira fase, designada por fase linear ou “lag”, que corresponde ao sinal de ruído do próprio aparelho. A segunda, a fase exponencial, em que se verifica um aumento acentuado do declive da curva, e ainda uma terceira fase,

denominada por fase estacionária ou “plateau”, em que o declive toma valores de aproximadamente zero.

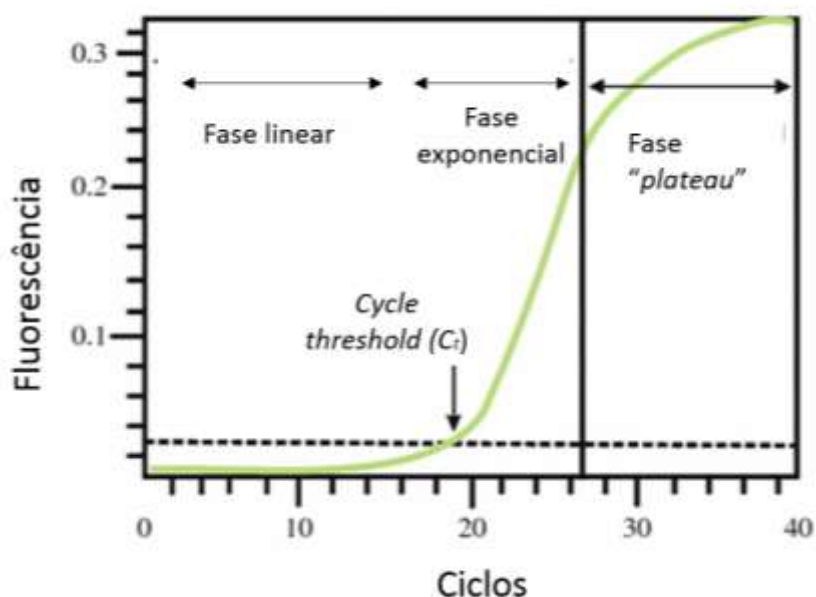


Figura 6 Cinética da PCR em tempo real (adaptada de Pestana, 2010).

A determinação da eficiência da amplificação é efetuada por aplicação da seguinte expressão:

$$E (\%) = \left(10^{\frac{1}{x}} - 1 \right) \times 100$$

em que E representa a eficiência da reação (%) e x o declive da reta obtida na representação gráfica de Ct em função do logaritmo da quantidade de ADN, o que corresponde a um valor de -3,32 quando E = 100% (Mazzara *et al.*, 2008).

O desenvolvimento da PCR em tempo real veio revolucionar a área da análise molecular, resolvendo algumas dificuldades associadas à PCR convencional. O facto de utilizar pequenos fragmentos, quando comparados com os da PCR convencional é uma vantagem porque facilita a cinética da reacção, tornando esta técnica aplicável a alimentos crus ou processados e a matrizes alimentares mais complexas (García-Cañas, 2004a). Esta técnica tem ainda outras vantagens como a redução significativa do tempo de reacção, o aumento da sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, precisão e ainda diminui a hipótese de contaminação por manipulação (Pestana, 2010).

Relativamente à quantificação de material geneticamente modificado presente numa amostra, esta pode ser efectuada por PCR em tempo real de duas formas diferentes (Weighardt, 2006). Recorrendo ao método da dupla curva de calibração, obtêm-se duas curvas de calibração, relativas à quantificação de ADN de sequências distintas: a primeira curva é obtida através da amplificação de um gene de referência da espécie; a segunda é obtida pela amplificação de uma sequência alvo específica de um dado evento GM. Para cada amostra, as quantidades absolutas dos alvos específicos do OGM e referenciada espécie são determinadas por interpolação com a respetiva curva padrão, e a percentagem de OGM é calculada pela razão entre a quantidade de ADN do OGM alvo e de ADN do gene de referência através da seguinte expressão:

$$\text{OGM (\%)} = \frac{\text{ADN (GM)}}{\text{ADN (referência)}} \times 100$$

O método do ΔCt consiste na amplificação de diferentes materiais de referência com concentrações conhecidas para as sequências alvo do OGM e para do gene de referência. A curva padrão é obtida através da utilização dos valores de Ct de cada alvo, usados para o cálculo dos valores da curva de ΔCt ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gene de referência}} - \text{Ct}_{\text{OGM}}$) em função do logaritmo da proporção de OGM. A quantidade de OGM (%) é calculada através do valor ΔCt da amostra, por interpolação na curva padrão. Este método requer que as eficiências de amplificação de ambos os alvos sejam semelhantes.

Devido a todos estes fatores, esta é uma técnica considerada, em muitos programas de garantia de qualidade, como a melhor ferramenta para quantificação de OGM.

1.7 A soja geneticamente modificada

Existem relatos que levam a crer que a soja teve origem na China, há cerca de 5000 anos, tendo a sua introdução na Europa ocorrido por volta de 1712, mas sem as condições climáticas e o solo apropriados, não foi viável o seu cultivo corrente. Posteriormente foi Carl von Linné que nomeou a soja de *Glycine max* (Cederroth & Nef, 2009; Mateos-Aparicio *et al.*, 2008). As sementes de soja são os constituintes da planta mais utilizados. Elas são uma fonte de proteínas de origem vegetal, daí ser considerada um excelente substituto da carne na alimentação vegetariana, possuindo também elevados teores de ácidos gordos insaturados

e fibras. Não contém colesterol e nem lactose, sendo por isso matéria prima para alimentos sem colesterol e para doentes intolerantes à lactose (Patisaul & Jefferson, 2010).

A soja com o nome comercial Roundup Ready[®] foi o primeiro evento GM a obter aprovação para alimentação humana e animal na EU e entre outros países. Foi desenvolvida pela empresa Monsanto para tolerar o herbicida com o mesmo nome, cujo principal componente ativo é o glifosato, sendo também designada por soja GTS40-3-2 (GMO Compass, 2015). Este herbicida é aplicado nas culturas para eliminar ervas daninhas. Assim esta linhagem de soja modificada possui a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) que lhe confere tolerância a esse composto. Esta enzima está envolvida na via do chiquimato, que regula a produção de aminoácidos aromáticos, bem como outros compostos da mesma natureza, nas plantas e que são necessários para a sua sobrevivência, inibindo a formação destes compostos. Assim, resulta numa diminuição da afinidade da planta para com o glifosato, fazendo por isso aumentar a sua tolerância ao mesmo. Esta linhagem é obtida por bombardeamento de microprojéteis de ouro revestidos pelo gene CP4-EPSPS, cuja expressão é regulada pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e contém uma sequência terminadora isolada da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (terminador NOS) (Figura 7) (Canhoto, 2010; CERA-GMC, 2015; ISAAA, 2015).

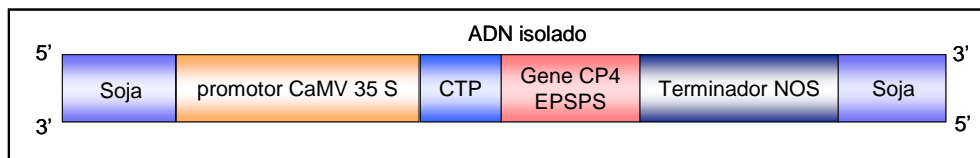


Figura 7 Esquema simplificado da construção inserida na soja RR (adaptado de Padgett et al., 1996).

I.8 Objetivos e âmbito do trabalho

Com base no elevado nível de segurança alimentar que a UE pretende manter, dada a importância da rastreabilidade e da verificação da presença de OGM nos alimentos, faz todo o sentido que sejam desenvolvidas e otimizadas técnicas para a sua deteção em produtos disponíveis no mercado de modo a verificar a conformidade com a rotulagem com legislação em vigor.

Este projeto teve então como objetivo a aplicação de técnicas com base na análise de ADN para a deteção e quantificação de soja RR, pois trata-se do primeiro evento autorizado para a alimentação humana e animal na UE, entre outros países, sendo também a principal cultura transgénica. Para tal, foram efetuadas três etapas experimentais: (i) extração de ADN de materiais de referência e alimentos; (ii) amplificação por PCR qualitativa de genes de referência, universais e elementos do evento da soja RR; (iii) amplificação por PCR em tempo real com sondas fluorescentes para confirmação dos resultados positivos e quantificação de soja RR. Por último, com os resultados quantitativos pretendeu-se verificar a conformidade da rotulagem quanto à presença de OGM.

Neste trabalho foram também realizados dois estudos interlaboratoriais, de 2014 e 2015, com o objetivo de verificar e validar os ensaios propostos para a quantificação de soja RR, por comparação com os resultados obtidos pelos outros laboratórios participantes.

2 COMPONENTE EXPERIMENTAL

2.1 Material e métodos

2.1.1 Descrição das amostras

Foram adquiridas 91 amostras comerciais de alimentos à base de soja, ou que continham soja na sua composição. Na escolha das amostras teve-se em conta diferentes características, na tentativa de analisar amostras com diferentes matrizes, nível de processamento, composição global, estado físico, bem como de diferentes marcas, desde as mais conhecidas e vendidas até às marcas brancas. Assim, conseguiu-se obter uma panóplia deste tipo de alimentos, representativo dos produtos existentes no mercado (Tabela 2) (Figura 8).



Figura 8 Amostras comerciais usadas neste trabalho.

2.1.2 Preparação das amostras

As amostras sólidas e pastosas foram trituradas num moinho de laboratório (Grindomix, GM200, Retsch, Haan, Alemanha). Todo o material utilizado para a preparação de cada amostra foi sujeito a uma esterilização química com uma solução comercial de hipoclorito de sódio, diminuindo assim a hipótese de contaminações.

Tabela 2 Composição das amostras comerciais analisadas.

Amostra	Ingredientes
1 *Hambúrguer de soja	Flocos de aveia, cebola, 12% soja texturizada, glúten de trigo, tomate, azeite, molho de soja (feijão de soja, trigo inteiro, <i>Aspergillus oryzae</i>), sal marinho, vinagre de maçã.
2 *Bife de soja com molho de tomate	89% soja hidratada, tomate frito, alho francês, açúcar integral, ácido cítrico, sal marinho, alho, orégãos.
3 *Bifes de soja	100% farinha de soja.
4 Farinheira (enchido vegetal)	Farinha de trigo, água, proteína de soja, amido, pimentão, sal, vinagre, especiarias naturais (canela, pimenta), conservante (benzoato de sódio).
5 Morcela (enchido vegetal)	Farinha de trigo, água, proteína de soja, cebola, alho, amido, sal, maltodextrina, caramelo, especiarias naturais (cominhos, pimenta), conservante (benzoato de sódio).
6 Chouriço (enchido vegetal)	Farinha de trigo, água, seitan, molho de soja, sal, vinho azeite, proteína de soja, alho, concentrado de tomate, amido, oleorresina de pimentão, vinagre, pimenta, conservante (benzoato de sódio).
7 Bolachas com laranja e soja	Farinha de trigo, açúcar, óleo vegetal, antioxidantes, 4,2% soja caramelizada, xarope de glucose e frutose, cereais extrudados, fibra de aveia, laranja, corantes, conservantes, levedantes químicos, emulsionantes, acidificantes, sal, leite magro em pó.
8 Bolachas de soja com pepitas de chocolate	Farinha de trigo, edulcorantes, gordura vegetal, pasta e manteiga de cacau, emulsionantes, leite magro em pó, amido de batata, 3,2% soja granulada, sal, gema de ovo, mistura de minerais, levedantes químicos, conservantes. Pode conter ómega 3.
9 Bolacha maria sem glúten	Farinha de milho, óleo vegetal, 18% açúcar, xarope de glucose e frutose, farinha de arroz, farinha de soja, fibra de ervilha, sal, levedantes químicos, emulsionantes.
10 Bolachas de chocolate e soja, sem açúcares adicionados	Farinha de trigo 51%, edulcorante: maltitol, óleo vegetal (girassol alto oleico) 14,5%, pedaços de chocolate sem açúcares 7%, [pasta de cacau, edulcorante: maltitol, manteiga de cacau, emulsionante: lecitina de soja, aroma de baunilha], fibra vegetal, proteína de soja 3,5%, levedante químico: bicarbonatos de sódio.
11 Bolacha maria de soja integral	60% farinha integral de trigo, Edulcorante (maltitol). 14% óleos e gorduras vegetais (palma, girassol e soja), farinha de malte (farelo de trigo, farinha de cevada, farinha de soja, germen de trigo), dextrina de milho, amido de milho, levedantes (bicarbonato de sódio e bicarbonato de amónio), emulsionante (lecitina de soja), antioxidante (E304), aromas.
12 Bolachas de cacau com pepitas de chocolate sem glúten	25% pedaços de chocolate (manteiga e pasta de cacau), farinha de milho, 16% óleo de girassol, açúcar, fécula de milho, xarope de glucose e frutose, 4% cacau natural, farinha de soja, sal, levedantes químicos, emulsionantes.
13 Bolacha com aveia, soja caramelizada, passas e alperce (Muesli)	50,5% farinha integral de trigo, óleo de girassol, 16,5% açúcar, 5% flocos de aveia, 5% de soja caramelizada, xarope de glucose e frutose, 2% passas de corinto, 2% preparado de alperce, sal, corantes, humectante, gelificante, acidificante, antioxidantes, gaseificantes.
14 Tofu natural	Água, 25,1% soja, gelificante (nigari).
15 Salsichas de tofu – finas ervas	36,8% tofu, óleo de girassol, albumina de ovo, levedura de cerveja, sal marinho, molho de soja, feijão de soja, trigo integral, sal marinho, <i>Aspergillus oryzae</i> , especiarias (pimenta, cardamomo, manjerona, noz moscada), espessante, emulsionantes.
16 Hambúrguer de tofu e algas	Glúten de trigo, 13,1% tofu (feijão de soja, água, nigari), flocos de aveia, borragem, brócolos, tomate, azeite, cebola, molho de soja (feijão de soja, trigo inteiro, sal marinho, <i>Aspergillus oryzae</i> , água), alho, sal marinho, 0,8% algas <i>wakame</i> , orégãos, pimenta branca.
17 Hambúrguer de tofu e algas	39% tofu (água, 25,1% soja, nigari), arroz integral, cebola, farinha de trigo integral, 10% tofu fumado, óleo de girassol, 5% molho de soja, 1% algas, sal marinho, salsa.
18 Hambúrguer de cogumelos	18% cogumelos, flocos de aveia, tofu (soja água e nigari), azeite, seitan, albumina de ovo, cebola, molho de soja, sal marinho, alho, caldo vegetal, especiarias.

Tabela 2 Composição das amostras comerciais analisadas (continuação).

Amostra	Ingredientes
19 Tofu biológico	Feijão de soja, nigari.
20 *Bebida em pó de soja natural	30% proteína de soja, gordura vegetal, xarope de milho, açúcar, fosfato de cálcio, citrato de potássio, lecitina, sal, vitaminas.
21 *Bebida de soja intensa	Água, 6,5% grãos de soja descascados, Reguladores de acidez, estabilizadores, vitaminas.
22 Bebida de soja	Água natural de montanha, 13,5% feijões de soja sem casca, xarope de glucose de milho, frutose, 0,27%carbonato de cálcio, alga <i>Chondrus crispus</i> , 0,024% vitaminas, sal marinho.
23 *Bebida de soja	Água, 5,9% grãos de soja descascados, açúcar de cana não refinado, sal marinho.
24 *Bebida de soja natural	Água, 13% grãos de soja.
25 Bebida de soja com cálcio	96,3% base de soja (água, 7,2% grãos de soja), açúcar, carbonato de cálcio, espessante, sal, regulador de acidez, vitaminas.
26 Bebida de soja de baunilha	92,5% base de soja(água, 7,2% grãos de soja), açúcar dextrose, fosfato tricálcico, espessantes, sal, corantes, vitaminas.
27 *Bebida de soja	Água, grãos de soja descascados (5,9%), açúcar, fosfato tricálcico, regulador de acidez (fosfato monopotássico), sal marinho, aroma, estabilizador (goma gelana), vitaminas (riboflavina (B2), B12, D2).
28 *Iogurte de soja, sabor a manga	78% sumo de soja (água, 9% grãos de soja), 11% manga, açúcar, fosfato de cálcio, espessantes, pectina, farinha de grãos de alfarroba, sumo concentrado de limão, fermentos.
29 Iogurte de soja com bagas e frutos vermelhos	76,7% bebida de soja (água, feijão de soja), 10% frutos vermelhos, 9,8% açúcar, amido modificado de tapioca, sais de cálcio, espessante, reguladores de acidez, sal, fermentos, vitamina E.
30 *Iogurte de soja natural	96,2% soja (água, 11% soja), açúcar de beterraba, amido de milho, sal, fermentos.
31 Natas para bater	Água, gordura vegetal hidrogenada, maltodextrina, açúcar, 2% grãos de soja descascados, emulsionantes, sal marinho.
32 Natas para cozinhar	Água, óleo de girassol, 4% grãos de soja descascados, xarope de frutose e glucose, emulsionantes, estabilizadores, sal marinho.
33 *Sobremesa de soja, sabor natural	Água, 9% feijão de soja, frutose, amido de milho, regulador de acidez, estabilizador, fosfato de cálcio, sal marinho.
34 *Sobremesa à base de soja com sabor a baunilha	Água, 6,4% grãos de soja descascados, espessantes, fosfato tricálcico, maltodextrina, sal marinho, vitaminas, corantes naturais.
35 Soja germinada	Rebentos de soja, água.
36 Feijão de soja em água	Feijão de soja, água.
37 Mugi Miso (cevada)	Soja em grão, cevada, água, koji (<i>aspergillus oryzae</i>), sal marinho.
38 *Esparguete integral, enriquecido com soja	90% sêmola integral de trigo duro, 10% farinha de soja desengordurada.
39 Feijão de soja	100% feijão de soja.
40 Soja fina	100% soja.
41 Soja em nacos	Soja texturizada.
42 Bebida de soja e morango	Água, açúcar, 8,5% grãos de soja, morangos, sumo de morango concentrado, citrato de cálcio, amido de milho, espessantes, sumo cenoura concentrado, ácido cítrico, regulador de acidez, vitaminas, fermentos lácteos (<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>).

Tabela 2 Composição das amostras comerciais analisadas (continuação).

Amostra	Ingredientes
43 Bebida de soja, alperce e pêsego	Água, açúcar, 8,5% grãos de soja, alperces, sumo de pêsego concentrado, citrato de cálcio, amido de milho, espessantes, sumo cenoura concentrado, ácido cítrico, regulador de acidez, vitaminas, fermentos lácteos (<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>).
44 Condensado de soja	Açúcar, água, óleo de palma, 5,4% extrato de soja, glicose de milho, sal refinado, estabilizantes.
45 Preparado sólido de soja com pedaços de alperce e goiaba	76,7% preparado de soja (água, 8,7% grãos de soja), 7,1% alperce, 2,9% goiaba, açúcar, amido modificado de tapioca, fosfato de cálcio, espessante, sal, fermento, vitamina E.
46 Sobremesa de soja, sabor a baunilha	Água, 6% soja, açúcar, amido de milho, maltodextrinas, óleo vegetal, espessante.
47 logurte de soja	Bebida de soja (água, 9,3% feijão de soja), frutose amido de milho, regulador de acidez, estabilizante, sais de cálcio, sal.
48 Bebida de soja e polpa de fruta, refrigerada	Água, açúcar, 6,7% grãos de soja, sumos e polpas de frutos, vitaminas.
49 Bebida à base de soja ultrapasteurizada	Água, 6,9% grãos de soja, açúcar, carbonato de cálcio, vitaminas.
50 Bebida de soja com cálcio	Água, 7,2% grãos de soja descascados, extrato de maçã, fosfato tricálcico, sal marinho.
51 Bebida à base de soja natural, ultrapasteurizada	Água, 12% grãos de soja, açúcar, maltodextrina, fosfato tricálcico, vitaminas.
52 Bebida à base de soja com baunilha, ultrapasteurizada	Água, 11% grãos de soja, açúcar, dextrose, carbonato de cálcio, sal, vitaminas, betacaroteno.
53 Bebida à base de soja com cacau, ultrapasteurizada	Água, 11% grãos de soja, açúcar, 1% cacau magro, 0,3% cacau, carbonato de cálcio, sal, vitaminas.
54 *Bebida de soja com cappuccino e cacau	Água, 11% sementes de soja, açúcar, 0,3% extrato de café, fosfato tricálcico, estabilizadores, 0,2% cacau magro, extrato de café descafeinado, antioxidantes, vitaminas.
55 Bebida de soja para crianças dos 1-3 anos	Água, 5% grãos de soja, maltodextrina, xarope de frutose e glucose, óleo vegetal, carbonato de cálcio, vitaminas, emulsionantes, pirofosfato férrico.
56 Salsicha de soja	Água, óleo de girassol, proteína isolada de soja (12%), glúten e albumina de ovo, dextrose, sal, aroma, especiarias e corante.
57 Alheira de tofu	Farinha de trigo e centeio, água, fermento, tofu, azeite pimentos, molho de soja, alho, pimenta, ervas aromáticas.
58 Enchido de soja (tipo chouriço)	Granulado de soja, farinha de trigo, pimentão, vinho, azeite, alho, sal marinho, especiarias.
59 Morcela de seitan	40% seitan, trigo, molho de soja, fécula de batata, azeite, alho, cebola, ervilha, especiarias, sal.
60 Enchido de soja (tipo farinheira)	Granulado de soja, farinhas (milho, centeio e arroz), pimentão, vinho, azeite, sal marinho, alho, especiarias.
61 Burguer de tofu e algas	Tofu, flocos de aveia, azeite, algas, proteína de trigo, bróculos, concentrado de tomate, albumina de ovo, cebola, molho de soja, sal marinho.
62 Tofu fumado	Tofu (feijão de soja, nigari), molho de soja (Shoyu), gengibre, alho, pimenta preta.
63 Seitan	Farinha de trigo, farelo de trigo, molho de soja, sal, alga kombu.
64 Bolachas sem sal	Farinha de trigo, 10% azeite extra virgem, extrato de malte, lecitina de soja, farinha de malte, levedura.
65 Bolacha maria integral	Farinha de trigo, xarope de frutose, gordura vegetal não hidrogenada, lecitina de soja, amido de milho.

Tabela 2: Composição das amostras comerciais analisadas (continuação)

Amostra	Ingredientes
66 Bolacha maria integral	60% farinha integral de trigo, 14% maltitol, óleos e gorduras vegetais (girassol, palma e soja), farelo de malte, amido de milho, levedantes, emulsionantes.
67 Bolacha integral 5 cereais e maçã	57% farinha de trigo, óleo de girassol, farinha de centeio, maçã em pó, fibras de aveia, farinha de arroz, levedantes químicos, lecitina de soja, antioxidante (metabissulfito de sódio), sucralose.
68 Bolacha integral de soja e laranja	Farinha de trigo, gordura de soja, extrato de malte, laranja em pó,
69 Soja Texturizada	100% soja.
70 Soja grossa	100% soja.
71 *Massa espiral enriquecida com soja e legumes	90% sêmola de trigo, 10% farinha de soja desengordurada, 5% legumes.
72 *Miso sabor original	Soja, arroz, sal, vinagre.
73 Miso Japonês	Soja, arroz, sal, vinagre.
74 *Tofu natural	Soja, proteína de soja, levedura.
75 *Tofu seco	Soja, óleo vegetal.
76 Barras de soja amarela	Soja amarela,, água, açúcar, molho de soja, especiarias.
77 Pasta de soja branca	Água, soja branca, farinha de trigo, sal.
78 Pasta de soja vermelha	Água, soja vermelha, farinha de trigo, sal.
79 Pasta de soja amarela	Água, soja amarela, farinha de trigo, sal.
80 Pasta de soja com molho de arroz	Água, soja, arroz, molho de soja.
81 Judias de soja negra	Feijão de soja negra.
82 Soja verde seca	100% soja.
83 Grão de soja amarela	100% soja.
84 Folhas de soja amarela	Soja, açúcar, óleo de soja seca.
85 Tofu seco com caldo de carne	Soja, leveduras, caldo de galinha.
86 Tofu picante	Soja, molho de soja, especiarias, chili.
87 Tofu sabor a grelhado	Soja, especiarias.
88 Massa com sabor a camarão	Farinha de trigo, óleo vegetal, proteína vegetal hidrolisada, molho de soja em pó, condimentos.
89 Pastel de luna – soja verde	Pasta de soja verde.
90 Pastel de Luna – soja vermelha	Pasta de soja vermelha.
91 Molho de soja	Grão de soja, trigo, sal, água, vinagre, aromatizantes, emulsionantes.

*Alimentos rotulados como isentos de OGM

Cada amostra foi posteriormente recolhida em recipientes esterilizados e armazenadas a -20°C . Já as amostras líquidas, como bebidas de soja, foram centrifugadas, enquanto as cremosas, como os iogurtes/sobremesas foram armazenadas como tal. As bebidas foram colocadas nuns tubos de centrífuga de 80 mL, centrifugadas a $18000 \times g$, 4°C , durante 25 minutos, sendo depois coletado o seu *pellet* e armazenado a -20°C .

2.1.3 Materiais de estudos interlaboratoriais

Adicionalmente, neste trabalho foram efetuados 2 estudos Interlaboratoriais, propostos semestralmente pela USDA/GIPSA. Estes estudos são no âmbito de um programa de proficiência, que pretende determinar o desempenho de laboratórios na deteção e/ou quantificação dos eventos GM de milho e soja, monitorizando então a capacidade de resposta dos laboratórios que integram o programa. Assim este programa serve também de referência para os próprios laboratórios, permitindo autoavaliarem o seu desempenho comparativamente com os restantes laboratórios. Para tal, foram adquiridas 4 farinhas de soja com adição de soja RR, entre outros eventos, em abril de 2014 (S.2014.4.1 a S.2014.4.1), e 2 farinhas semelhantes em abril de 2015 (S.2015.4.1 e S.2015.4.2).

2.1.4 Materiais de Referência

Os materiais de referência certificados utilizados foram produzidos pelo Institute for Research Materials and Measurements (IRMM, Geel, Bélgica) e comercializados pela Fluka (Chemie GmbH, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Os materiais incluíram dois conjuntos de farinhas para o evento de soja geneticamente modificada Roundup Ready: um com as proporções de 0%, 0,1%, 1%, 2% e 5%; e um segundo conjunto com as proporções de 0%, 0,1%, 1% e 10% (Tabela 3). Os materiais de referência foram particularmente importantes na otimização e validação dos métodos de deteção, sendo utilizados como controlos positivos nas PCR, tanto a nível qualitativo como quantitativo e que permitiram controlar e verificar a qualidade da reação (Trapmann *et al.*, 2010).

2.1.5 Reagentes e Soluções

Tampão de extração TNE: Pesou-se 1 g de SDS e juntou-se 1 mL de Tris-HCl (1 M), 3 mL de NaCl (5 M) e 0,4mL de EDTA (0,5 M). Dissolveu-se a mistura em água desionizada. Após acertar o pH para 8, com NaOH ou HCl, completou-se o volume até 100 mL com água desionizada e autoclavou-se a solução durante 15 minutos a 121°C .

Tabela 3 Materiais de referência certificados (IRMM) utilizados neste trabalho.

Código do Material de Referência	Valor Certificação (g/kg)	Incerteza (g/kg)
BF410a (Blank)	<0,3	-
BF410b (0,1%)	1,0	0,5
BF410d (1%)	10,0	1,6
BF410e (2%)	20,0	2,6
BF410gk (5%)	50,0	5,3
BF410ak (Blank)	<0,7	-
BF410bk (0,1%)	1,0	0,5
BF410dk (1%)	10,0	1,0
BF410gk (10%)	100,0	7,0

Hidrocloreto de guanidina (Gu-HCl) (5 M): Dissolveram-se 4,78 g de Gu-HCl em água desionizada. Completou-se o volume até 10 mL e autoclavou-se durante 15 minutos a 121°C.

Proteinase K (20 mg/mL): Pesaram-se 20 mg de proteinase K, adicionaram-se 1000 µL de água ultra pura e armazenou-se a solução a -20°C.

Tampão TE (1x): Juntaram-se 0,5 mL de solução de Tris 1 M e 0,1 mL de solução EDTA 0,5 M em 50 ml de água desionizada, obtendo-se a solução de TE 1x.

Tampão TE (0,1x): A solução TE 0,1x foi preparada por diluição da solução TE 1x em água desionizada. Autoclavou-se a solução durante 15 minutos a 121°C.

Tampão de carregamento (6x): Dissolveram-se 4 g de sacarose e 5 mg de azul de bromofenol em cerca de 5 mL de água desionizada. Adicionaram-se 2,4 mL de solução de EDTA 0,5 M e completou-se o volume até 10 mL. Autoclavou-se e armazenou-se a -20°C.

dNTP (10 mM): Juntaram-se 50 µL de cada dNTP *stock* 100 mM com 1800 µL de água ultra pura. De seguida armazenou-se a solução a -20°C.

2.1.6 Extração do ADN

Como já foi referido anteriormente, a eficiência da extração de ADN pode ser influenciada pelo tipo de matriz ou pelo tipo de interferentes que possam conter. Por esse motivo, foram utilizados dois métodos distintos para a realização deste passo (Costa *et al.*, 2010).

2.1.6.1 Método Wizard

Este método consiste na utilização parcial de um *kit* comercial Wizard[®] Plus Minipreps (Promega, Madison, WI, EUA), baseado no método descrito por Lipp *et al.*, (1999) e com algumas alterações descritas por Mafra *et al.*, (2008b). Para este método pesaram-se cerca de 100 mg de cada uma das amostras sólidas, 500 mg das líquidas e cremosas na sua forma natural ou pellet total das amostras que sofreram centrifugação, para um tubo de reação esterilizado de 2 mL. Seguidamente adicionaram-se 860 µL de tampão de extração TNE (10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA e 1% de SDS), responsável pela lise celular e precipitação das proteínas, pré-aquecido em banho-maria a 60°C para provocar um choque térmico e facilitar a lise celular, 100 µL de solução de Gu-HCl, que permite a desnaturação dessas proteínas, e 40 µL de solução de proteínase K, utilizada na digestão enzimática. Agitou-se no vórtex e procedeu-se à sua incubação durante 3 horas a 60°C, com agitação a 950 r.p.m., agitando, adicionalmente, a cada 30 minutos no vortéx. De seguida procedeu-se a uma centrifugação a 4°C, durante 15 minutos e a uma velocidade 17.000 x g. No final, pipetou-se todo o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL, realizando uma nova centrifugação nas mesmas condições, mas agora durante 5 minutos. Após as duas centrifugações, pipetou-se novamente o máximo de sobrenadante para novo tubo esterilizado de 2 mL, adicionando-se 1 mL de resina de purificação de DNA Wizard[®] (Promega, Madison, WI, EUA) e misturou-se por inversão. A mistura, de resina e amostra, foi eluída recorrendo às colunas do Kit Wizard[®] Plus Minipreps *DNA Purification System*, tendo sido utilizado um êmbolo de uma seringa de 2 mL para facilitar a passagem da mistura pela coluna. De seguida, procedeu-se à lavagem com 2 mL de solução de isopropanol (80% v/v). Depois houve necessidade de remover totalmente o isopropanol, então centrifugou-se a coluna 2 minutos, 10.000 x g e incubou-se, durante 5 minutos, à temperatura ambiente para a sua completa secagem. Seguidamente, para a eluir o ADN retido na coluna, as colunas foram colocadas num novo tubo esterilizado de 1,5 mL, adicionando-se 100 µL de tampão TE 0,1x, pré-aquecido a 70°C, deixou-se incubar, durante 1 minuto, à temperatura ambiente e centrifugou-se 1 minuto a 10.000 x g, obtendo-se o extrato do ADN. Em todas as extrações foi efetuada uma extração suplementar, em que apenas continha todas as soluções utilizadas no método, sem que qualquer amostra fosse adicionada, a esta reação foi dada a designação de “branco”, servindo como indicador de potencial contaminação durante todo o processo de extração. Para finalizar, todos os extratos obtidos foram armazenados a -20°C até posterior análise.

2.1.6.2 Método Nucleospin

Este método de extração, ao contrário do anterior, baseia-se totalmente na utilização de um kit comercial (Nucleospin® Food, da Macherey-Nagel), que contém as colunas e as soluções CF, Proteínase K, C4, CQW, C5 e CE referenciadas no procedimento seguinte. Pesaram-se cerca de 200 mg da amostra. De seguida adicionaram-se 550 µL da solução tampão (para a lise das células) CF, pré-aquecida a 65°C, juntando-se 10 µL da solução de Proteínase K. Procedeu-se à agitação da mistura no vórtex e incubou-se durante 1 h hora a 65°C com agitação a 900 r.p.m., fazendo agitações suplementares com o vórtex a cada 30 minutos. Após a incubação, procedeu-se à centrifugação a 4°C, durante 10 minutos a 17000 x g, transferindo, depois, o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL, repetindo-se a centrifugação nas mesmas condições, mas por apenas 5 minutos, transferindo novamente o sobrenadante para um novo tubo de 2 mL. Este último sobrenadante foi contabilizado, para assim ser adicionado igual volume da solução C4 e igual volume de etanol (100%, v/v), misturando por inversão. Após esta mistura, colocou-se por duas vezes cerca de 700 µL na coluna, dado que a coluna tem capacidade máxima de 750 µL, e no final de cada uma destas adições centrifugou-se durante um minuto a 10000 x g. De seguida, procedeu-se a uma primeira lavagem com 400 µL de CQW e centrifugou-se durante 1 minuto a 10000 x g, seguindo-se uma segunda lavagem, adicionando-se 700 µL da solução C5, centrifugando a 10000 x g durante um minuto. Antes da eluição, efetuou-se a terceira lavagem adicionando 200 µL da solução C5 e centrifugando a 10000 x g, durante 2 minutos, eluindo-se de seguida, para um novo tubo de 1,5 mL, com 100 µL da solução CE, previamente aquecida a 70°C. Deixou-se incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente, centrifugando, a seguir, durante 1 minuto a 10000xg obtendo o extrato final de ADN. Tal como no método anterior, neste também foi efetuada extração sem amostra (branco). E novamente, todos os extratos foram armazenados a -20°C.

2.1.7 Análise do ADN extraído

Para verificar a qualidade e integridade do ADN extraído, foi realizada uma eletroforese em gel de 1% de agarose em tampão SGTB 1x (GRiSP, Research Solutions, Porto, Portugal), durante 25 minutos a 200 V. No primeiro poço do gel foram aplicados 5 µL de marcador molecular HyperLadder e nos restantes foram aplicados 5 µL de extrato de ADN com 2 µL de tampão de carregamento 6x. Na preparação do gel foi adicionado Gel Red 1x (Biotium, Hayward, CA, EUA), o que permitiu, posteriormente, a deteção das bandas por

espectrofotometria de UV, tendo a imagem sido captada pelo sistema fotográfico Gel Doc™ Ez System (BioRad) e analisada com o *software* Image Lab™.

A concentração e pureza do ADN foram avaliadas por espectrofotometria de UV/VIS, pelo leitor de microplacas multideteção Synergy™ HT (Biotek Instruments, Winooski, EUA) e analisadas com o *software* Gen5 v2.01. A determinação da concentração e pureza dos extratos foram efetuadas usando o *software* de análise de dados Gen5 v2.01 por medição das absorvências (A) a 260 nm, 280 nm e 320 nm. Estes comprimentos de onda correspondem aos máximos de absorção UV de ADN, proteínas e material estranho, respetivamente. A pureza dos extratos foi determinada pela razão das absorvências a 260 nm e 280 nm, onde valores perto de 1,8 representam extratos com elevada pureza. A absorvência a 320 nm funciona como controlo da presença de contaminantes, sendo que o valor ideal seria nulo. Para determinação das concentrações, foram utilizadas as leituras a 260 nm e aplicada a equação $C = A_{260nm}/0,02$ (ng/μL) (Somma, 2006)

2.1.8 PCR Qualitativa

Para avaliar a capacidade de amplificação do ADN de cada extrato, procedeu-se à amplificação por PCR com alvo no gene da lectina soja, por ser o controlo endógeno da espécie. Posteriormente, para os extratos que amplificaram positivamente para a lectina da soja, efetuaram-se novas amplificações por PCR, mas agora com *primers* para sequências específicas do evento RR de soja (Tabela 4). Estas amplificações foram realizadas, preparando uma mistura de reação com água ultrapura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), tampão (670 mM Tris-HCl, pH 8,8, 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20), MgCl₂, dNTP (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), enzima SuperHot Taq Polymerase™ (Genaxxon Bioscience GmbH, Alemanha), *primers* (Tabela 4) e extrato de ADN para um volume final de 25 μL, conforme a Tabela 5.

Tabela 4 *Primers* utilizados na amplificação por PCR qualitativa.

<i>Primers</i>	Sequências (5'→3')	Alvo	Amplificação	Referência
LE3-F LE4-R	GCA AAG CAA TGG CTA CTT CAA TGA GTT TGC CTT GCT GGT CAG T	Gene da Lectina	120 pb	Mafra et al. (2008b)
RRS-3J1-F RRS-3J3-R	TCT ACA TAT AGC TTC TCG TTG AAC TTC TCG ACG ATG GCC G	NOS 3'UTR/ Planta	106 pb	Costa et al. (2010)
18SRG-F 18SRG-R	CTG CCC TAT CAA CTT TCG ATG GTA TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT CA	18S rARN	113 pb	Costa et al. (2013)

Tabela 5 Componentes das misturas reacionais para os ensaios de PCR.

	Gene da Lectina	NOS 3`UTR/ Plant	18S rARN	
	LE3-F/ LE4-R	RRS-3J1-F/ RRS-3J3-R	18SRG-F/ 18SRG-R	
Componentes (µL)	Água Ultrapura	14,9	14,3	15,6
	Tampão (10x)	2,5	2,5	2,5
	MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,0	2,0
	dNTP (2,5 mM cada)	2,0	2,0	2,0
	Primer Forward (10 µM)	0,7	1,0	1,5
	Primer Reverse (10 µM)	0,7	1,0	0,6
	Taq Polimerase (5 U/µL)	0,2	0,2	0,6
	Extrato de ADN (100 ng/µL)	2,0	2,0	2,0
	Volume Total		25	

As condições de tempo e temperaturas para as reações de amplificação foram as apresentadas na Tabela 6 e foram efetuadas num termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, EUA).

Tabela 6 Condições de tempo e temperatura utilizadas nos ensaios PCR.

	Gene da Lectina e NOS 3`UTR/Planta		18S rARN	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Desnaturação	94°C	5 min	95°C	5 min
Amplificação	Desnaturação	94°C	95°C	30 s
	Hibridação	60°C	65°C	30 s
	Extensão	72°C	72°C	30 s
	Nº Ciclos	40	32	
Extensão Final	72°C	5 min	72°C	5 min

2.1.9 PCR quantitativa em tempo real

A PCR em tempo real foi a técnica utilizada não só para confirmação dos resultados da PCR qualitativa, como também para quantificar a presença do evento da soja GM em estudo. A técnica baseou-se na metodologia descrita na ISO21570 (2005) para a deteção quantitativa de soja GM por PCR em tempo real, com algumas modificações. Os *primers* utilizados foram os pares LE1/LE2 e RRS-F/RRS-R, em conjunto com as sondas LE-P e RRS-TMP, sendo ambas sondas de hidrólise do tipo TaqMan™, para deteção e quantificação do gene endógeno da soja e os para sequências específicas deste evento, respetivamente (Tabela 7).

Tabela 7 Primers e sondas utilizados na amplificação por PCR em tempo real.

Primers	Sequências (5'→3')	Alvo	Amplicação	Referência
LE1-F	CCA AGC AAT GGC TAC TTC AAA G	Gene da Lectina	103 pb	Mafra <i>et al.</i> , (2008b)
LE2-R	TGA GTT TGC CTT GCT GGT CAG T			
LE-P	FAM-TTG TAT CTC TCT CCC TAA CCT TAA CCT TGG TA -BHQ1			
RRS-F	GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT	CTP/35S Junction	83 pb	ISO21570 (2005)
RRS-R	GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C			
RRS-TMP	FAM-CTT GAA AGA TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG-BHQ2			

Os ensaios foram realizados num termociclador fluorométrico CFX96 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) nas condições apresentadas na Tabela 8. As reações foram efetuadas num volume total de 20 µL, em que a mistura foi preparada adicionando 10 µL de SsoFast™ Probes Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e volumes variáveis de *primers*, sondas e água ultrapura (Tabela 9).

Tabela 8 Condições de tempo e temperatura dos ensaios de PCR em tempo real.

		Temperatura	Tempo
Desnaturação		95°C	5 min
Amplificação	Desnaturação	95°C	30 s
	Hibridação/ Extensão	60°C	1 min
	Nº Ciclos	45	

Tabela 9 Componentes das misturas reacionais para os ensaios de PCR em tempo real.

		Gene da Lectina	CTP/35S Junction
Componentes (µL)	Água Ultrapura	5,2	4,2
	Supermix (10x)	10,0	10,0
	Primer Forward (10 µM)	1,2	1,8
	Primer Reverse (10 µM)	1,2	1,8
	Sonda (10 µM)	0,4	0,2
	Extrato ADN (50 ng/µL)	2,0	2,0
	Volume Total	20,0	20,0

2.2 Resultados e discussão

2.2.1 Avaliação da integridade, qualidade e pureza do ADN extraído

2.2.1.1 Integridade

A avaliação da integridade do ADN presente nos extratos foi efetuada por eletroforese em gel de agarose 1%, podendo assim verificar-se o estado do ADN genómico. Na Figura 9 é visível o ADN genómico presente nos produtos de extração das amostras em análise. É então possível verificar a presença de bandas de elevada massa molecular (superior a 10.000 pb). O arrastamento evidencia alguma degradação do ADN, podendo também ser indicativo da existência de alguma contaminação com ARN.

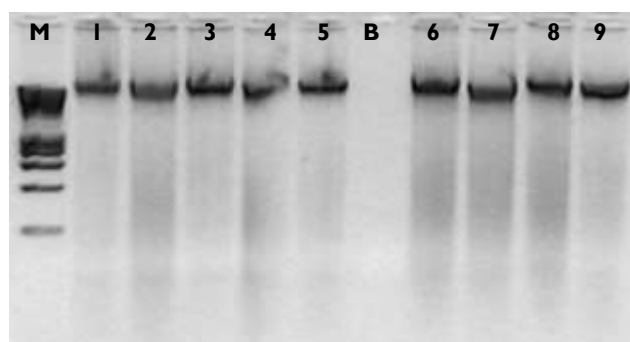


Figura 9 Eletroforese em gel de agarose 1%, do ADN extraído. Linha M – marcador HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). Linhas 1 a 5 – amostras comerciais. Linha B – branco de extração. Linhas 6 a 9 – amostras de farinhas do estudo Interlaboratorial (2014).

2.2.1.2 Qualidade e pureza

As purezas e concentrações do ADN extraído foram avaliadas por espectrofotometria de UV/VIS. Foram realizadas leituras de absorvência (ou densidade ótica) para os comprimentos de onda de 260 nm e de 280 nm. Na Tabela 10, apresentam-se os resultados da avaliação da concentração e pureza dos extratos provenientes de amostras comerciais de farinhas obtidas de estudos interlaboratoriais - USDA/GIPSA Proficiency Program (2014 e 2015). A partir dos resultados apresentados na Tabela 10, é possível observar que, de uma maneira geral, os extratos apresentaram elevado rendimento (> 100 ng/ μ L) e purezas entre 1,6-2,0,

Tabela 10 Concentrações e purezas obtidas nos extratos de ADN das amostras comerciais analisadas.

Amostra	Método de Extração	Concentração (ng /μL)	Pureza (A₂₆₀ /A₂₈₀)
SJ_110	Wizard	185,7	1,8
SJ_111	Wizard	559,2	2,1
SJ_112	Wizard	853,8	2,0
SJ_113	wizard	197,5	1,7
SJ_114	wizard	230,0	1,7
SJ_115	Wizard	272,0	1,9
SJ_116	Wizard	231,6	1,9
SJ_117	Wizard	159,6	1,7
SJ_118	Wizard	204,4	1,9
SJ_119	Wizard	171,4	1,6
SJ_120	Wizard	150,7	1,8
SJ_121	Nucleospin Food	179,1	1,8
SJ_122	Wizard	349,6	1,9
SJ_123	Wizard	152,0	1,5
SJ_124	Wizard	91,9	1,8
SJ_125	Wizard	145,2	1,8
SJ_126	Wizard	143,4	1,7
SJ_127	Wizard	99,5	1,8
SJ_128	Wizard	229,4	1,7
SJ_129	Wizard	287,5	1,8
SJ_130	Wizard	279,3	2,2
SJ_131	wizard	41,0	1,6
SJ_132	Wizard	243,2	1,9
SJ_133	Wizard	461,5	1,8
SJ_134	Wizard	191,3	1,9
SJ_135	Wizard	324,6	2,1
SJ_136	Wizard	381,5	2,1
SJ_137	Wizard	549,4	2,2
SJ_138	Wizard	517,2	2,2
SJ_139	Wizard	600,1	2,2
SJ_140	Wizard	53,07	2,0
SJ_141	Wizard	216,1	2,2
SJ_142	Wizard	211,4	2,1
SJ_143	Wizard	276,3	2,2
SJ_144	Wizard	60,1	2,2
SJ_145	Wizard	134,0	1,7
SJ_146	Wizard	15,6	1,6
SJ_147	Wizard	508,7	1,9
SJ_148	Wizard	766,8	2,2
SJ_149	Wizard	948,8	2,0
SJ_150	Wizard	489,0	1,8
SJ_151	Nucleospin Food	667,6	2,2
SJ_152	Wizard	745,2	2,2
SJ_153	Wizard	125,8	2,0
SJ_154	Nucleospin Food	673,3	2,2
SJ_155	Wizard	41,6	1,5
SJ_156	Wizard	316,8	2,1
SJ_157	Wizard	469,8	2,1
SJ_158	Wizard	348,9	2,0
SJ_159	Wizard	953,1	2,1
SJ_160	Wizard	870,7	2,1
SJ_161	Wizard	351,2	1,8
SJ_162	Wizard	36,7	1,4
SJ_163	Nucleospin Food	486,7	2,0
SJ_164	Wizard	860,8	2,2
SJ_165	Wizard	104,8	1,6
SJ_166	Wizard	307,7	2,0
SJ_167	Nucleospin Food	125,3	1,9
SJ_168	Wizard	162,0	1,8
SJ_169	Wizard	126,3	1,8
SJ_170	Wizard	167,5	1,9

Tabela 10 Concentrações e purezas obtidas nos extratos de ADN das amostras comerciais analisadas (continuação).

Amostra	Método de Extração	Concentração (ng /μL)	Pureza (A₂₆₀ /A₂₈₀)
SJ_171	Wizard	604,5	2,2
SJ_172	Wizard	290,3	1,9
SJ_173	Wizard	472,6	1,9
SJ_174	Wizard	346,1	1,9
SJ_175	Nucleospin Food	242,8	1,8
SJ_176	Wizard	422,4	1,9
SJ_177	Wizard	681,5	2,0
SJ_178	Wizard	608,5	1,9
SJ_179	Wizard	770,3	1,9
SJ_180	Wizard	1385,6	2,0
SJ_181	Wizard	39,0	1,8
SJ_182	Wizard	17,7	1,6
SJ_183	Nucleospin Food	407,3	2,2
SJ_184	Nucleospin Food	768,6	2,2
SJ_185	Nucleospin Food	945,9	2,1
SJ_186	Wizard	62,41	1,6
SJ_187	Wizard	28,72	1,5
SJ_188	Wizard	28,73	1,7
SJ_189	NucleoSpin Food	27,17	1,8
SJ_190	Nucleospin Food	1005,0	2,0
SJ_191	Wizard	928,7	2,2
SJ_192	Nucleospin Food	714,9	1,9
SJ_193	Nucleospin Food	1193,7	2,1
SJ_194	Nucleospin Food	557,2	2,0
SJ_195	Wizard	203,4	1,8
SJ_196	Wizard	168,4	1,7
SJ_197A	Wizard	458,3	2,0
SJ_197B	Wizard	166,7	1,8
SJ_198	Wizard	477,0	2,1
SJ_199	Wizard	369,1	2,1
SJ_200	NucleoSpin Food	NQ*	-
S.2014.4.1.	Wizard	221,2	2,0
S.2014.4.2.	Wizard	223,4	2,0
S.2014.4.3.	Wizard	259,5	2,0
S.2014.4.4.	Wizard	147,1	1,9
S.2015.4.1.	Wizard	873,8	2,0
S.2015.4.2.	Wizard	921,8	2,0

*NQ – não quantificável.

com alguns valores de pureza um pouco acima, demonstrando a adequação dos métodos de extração para as matrizes analisadas. Alguns dos extratos com menor concentração de ADN foram também os que apresentaram valores mais baixos de pureza. Nota-se ainda que, os valores das concentrações obtidas variaram acentuadamente, o que se pode dever à elevada heterogeneidade das matrizes constituintes das amostras comerciais analisadas. Estas apresentavam diferentes níveis de processamento e uma grande variedade de ingredientes, assim como diferentes proporções dos mesmos. Por esse motivo, neste trabalho, foram considerados aceitáveis valores de pureza compreendidos entre 1,4 e 2,2.

No caso da amostra SJ_200 (molho de soja), os valores das leituras espectrofotométricas não permitiram a quantificação de ADN, o que se poderá relacionar com a natureza da sua matriz e processamento a que este género alimentício possa ter sido sujeito.

2.2.2 PCR qualitativa

2.2.2.1 Amplificação do gene da lectina da soja

Para otimização dos ensaios de PCR, utilizaram-se numa primeira fase os materiais de referência com 0%, 0,1%, 1%, 2% e 5% do evento RR da soja. Considerando a amplificação do gene da lectina (Figura 10), verificou-se que, como era esperado, todos os materiais de referência apresentaram fragmentos com bandas intensas já que todos possuíam quantidades semelhantes de soja. No caso da amplificação de sequências específicas para a soja RR, todos os materiais foram positivos com exceção do 0%. Os resultados confirmam ainda que a técnica possui um limite de detecção de 0.1% para a soja RR (Figura 11).

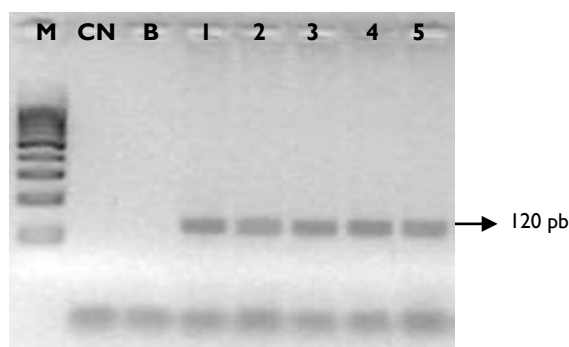


Figura 10 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação do gene da lectina, com os primers LE3-F e LE4-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linha CN– controle negativo. Linha B –branco de extração. Linhas 1 a 5 - Materiais de referência de 0%, 0,1%, 1%, 2% e 5%, respetivamente.

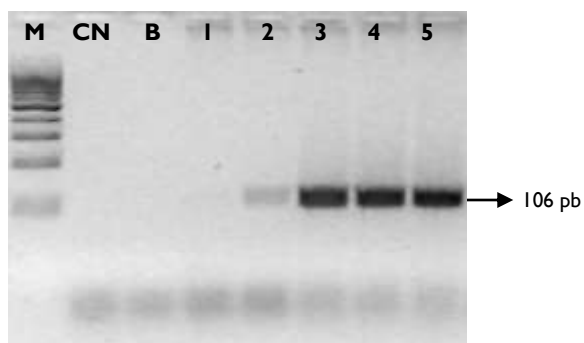


Figura 11 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação das sequências específicas para o evento de soja RR, com os primers RRS-3J1-F e RRS-3J3-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linha CN – controle negativo Linha B – branco de extração. Linhas 1 a 5 – materiais de referência de 0%, 0,1%, 1%, 2% e 5%, respetivamente.

A amplificação do gene da lectina (gene endógeno da soja, *Glycine max* L.), por PCR qualitativa, permitiu avaliar a capacidade dos extratos para a amplificação de ADN e ainda

testar a presença de ADN de soja em todas as amostras. Esta reação foi realizada utilizando os *primers* LE3-F e LE4-R, obtendo-se assim fragmentos com 120 pb (Figura 12). Das 91 amostras analisadas, 72 foram positivas para o gene da lectina, o que corresponde a cerca de 80% do total de amostras analisadas.

Foram também analisadas as amostras de 2 estudos interlaboratoriais, efetuando-se também uma amplificação com recurso aos mesmos *primers* e condições utilizadas para as amostras comerciais (Figuras 13 e 14). Do estudo Interlaboratorial de 2014, verificou-se que todos os extratos apresentaram bandas, o que significa que todos eles foram positivos para a presença do gene da lectina.

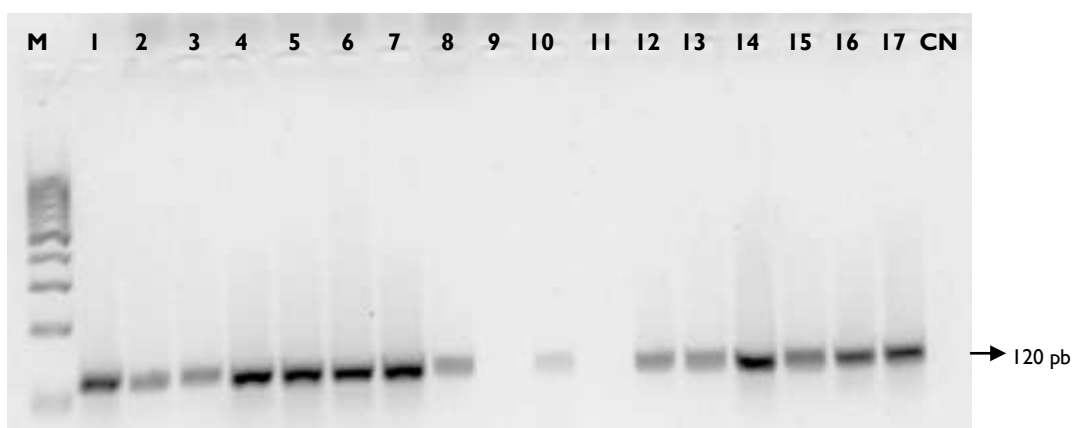


Figura 12 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do gene da lectina, com os *primers* LE3-F e LE4-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linhas 1 a 17 – amostras comerciais. Linha CN – controlo negativo.

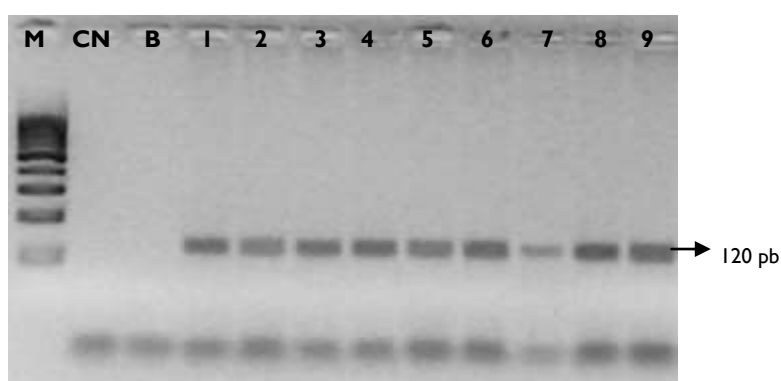


Figura 13 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação do gene da lectina, com os *primers* LE3-F e LE4-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linha CN – controlo negativo. Linha B – branco de extração. Linhas 1 a 5 – amostras de materiais de referência. Linhas 6 a 9 – amostras de estudo interlaboratorial de 2014.

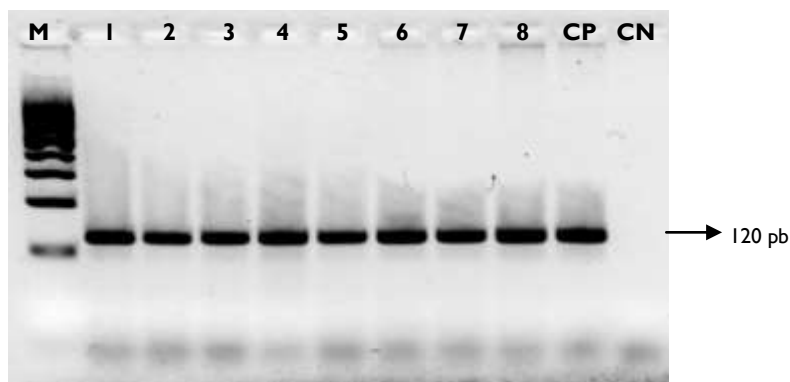


Figura 14 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação do gene da lectina, com os primers LE3-F e LE4-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linhas 1 a 6 – amostras comerciais. Linhas 7 e 8 – amostras do estudo interlaboratorial de 2015. CP – controlo positivo. CN – controlo negativo.

2.2.2.2 Amplificação de específica do evento de soja RR

Uma vez avaliada a capacidade de amplificação do ADN de cada extrato, as amostras positivas foram submetidas a amplificação por PCR, tendo como alvo sequências específicas para o evento da soja RR. Esta amplificação foi realizada utilizando os primers RRS-3J1-F e RRS-3J3-R, os quais originaram fragmentos com 106 pb (Figura 15). Das 72 amostras previamente positivas para o gene da lectina, 6 apresentaram resultados positivos para este evento, o que se traduz numa percentagem de 8,3% de amostras positivas. Das 4 amostras do estudo interlaboratorial de 2014, 3 também apresentaram banda que comprova a presença de soja RR nessas amostras (Figura 16). Na Figura 17, pode verificar-se a presença de banda numa das duas amostras do estudo interlaboratorial de 2015, o que indica que apenas uma das duas amostras contém soja RR.

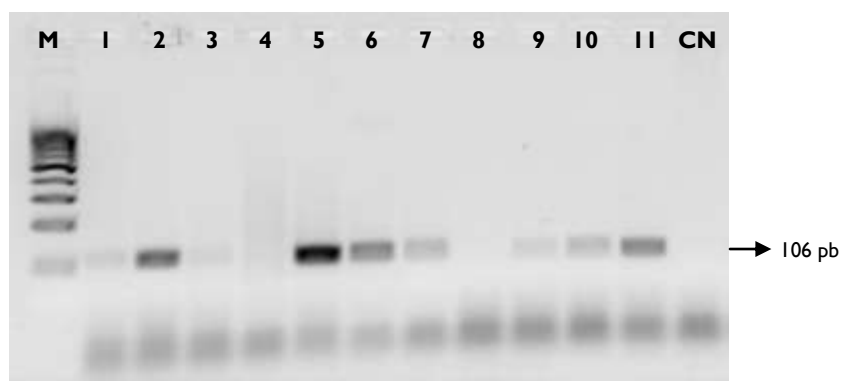


Figura 15 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação das sequências específicas para o evento de soja RR, com os primers RRS-3J1-F e RRS-3J3-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linhas 1 a 7 – amostras comerciais. Linhas 8 a 11 - materiais de referência 0%, 0,1%, 1% e 10% de soja RR, respetivamente. Linha CN – controlo negativo.

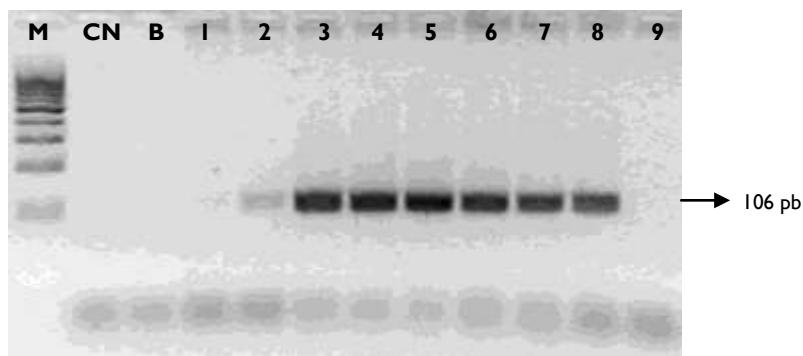


Figura 16 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação das sequências específicas para o evento de soja RR, com os primers RRS-3J1-F e RRS-3J3-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linha CN – controlo negativo Linha B – branco de extração. Linhas 1 a 5 - materiais de referência de 0%, 0,1%, 1%, 2% e 5%, respetivamente. Linhas 6 a 9 – amostras do estudo interlaboratorial de 2014.

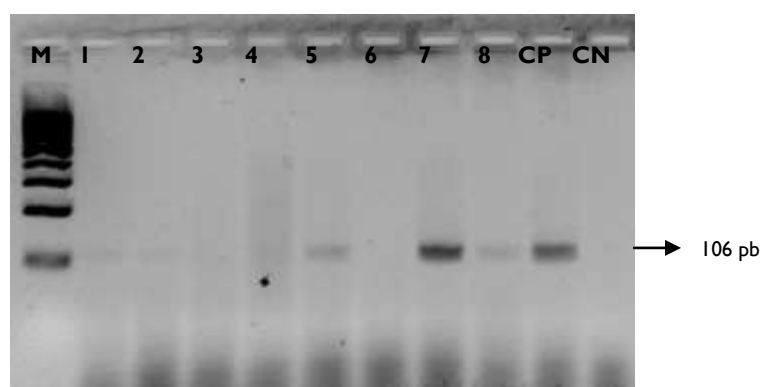


Figura 17 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação das sequências específicas para o evento de soja RR, com os primers RRS-3J1-F e RRS-3J3-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linhas 1 a 6 – amostras comerciais. Linhas 7 e 8 – amostras do estudo interlaboratorial de 2015. CP – controlo positivo. CN – controlo negativo.

2.2.2.3 Amplificação do gene universal para eucariotas

Para as amostras nas quais não foi possível a amplificação do gene da lectina, foi efetuada uma a amplificação com alvo num gene universal de eucariotas, utilizando os *primers* 18SRG-F e 18SRG-R para dar origem a fragmentos de 113 pb (Figura 18). Todas as amostras testadas foram positivas para esta reação, excetuando uma amostra (SJ162), significando que dos 19 extratos negativos para a lectina, apenas um não apresentava ADN amplificável. Assim, 18 amostras possuíam ADN amplificável, o que revela que nessas 17 amostras o ADN extraído correspondia a outra espécie que não a soja. A amostra na qual não foi detetado qualquer ADN amplificável, trata-se de uma bebida de soja com cacau ultrapasteurizada. Tal facto, poderá ter-se devido ao elevado nível de processamento, com conseqüente degradação do ADN e à presença de inibidores da PCR provenientes do cacau.

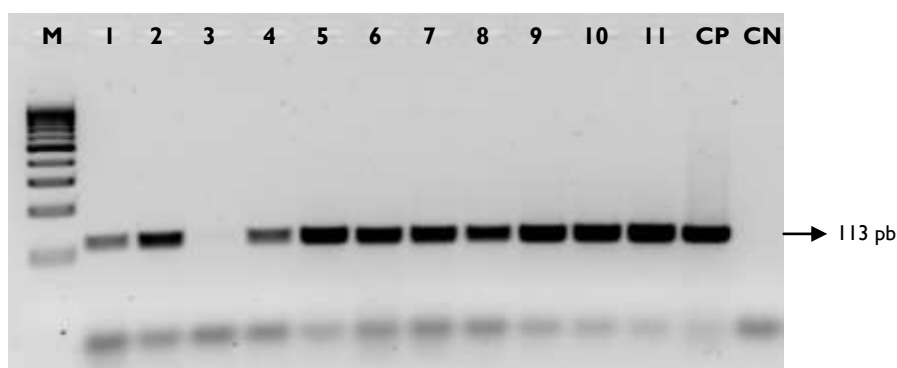


Figura 18 Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR de amplificação de uma sequência universal de eucariotas com os *primers* 18SRG-F/18SRG-R. Linha M – marcador (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha). Linhas 1 a 10 – amostras comerciais que não amplificaram para com os primers para o gene da lectina. CP – controlo positivo. CN – controlo negativo.

2.2.3 Quantificação por PCR em tempo real

Após ter sido verificada a presença de soja RR em algumas amostras, torna-se de extrema importância a confirmação desses resultados e, principalmente, a quantificação do material GM presente no alimento de forma a poder verificar o cumprimento do requisito da legislação, o qual indica a obrigatoriedade de rotular proporções de OGM acima dos 0,9%. Assim, tornou-se essencial a aplicação pela técnica de PCR em tempo real nas amostras que demonstraram ser positivas para este evento na PCR qualitativa, para determinar o grau de contaminação dessas mesmas amostras. A utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan™ permitiu aumentar a especificidade da reação.

Para a quantificação utilizou-se o método da dupla curva de calibração, efetuando-se uma diluição seriada de 1/3 do extrato de material de referência com maior presença de soja RR (10%) com uma concentração inicial de 100 ng/μL, obtendo-se assim 7 pontos de calibração, conforme a Tabela 11.

Tabela 11 Concentrações e quantidades de ADN dos padrões obtidos por diluição seriada de um extrato do material de referência com 10% de soja RR.

Padrão	Concentração (ng /μL)	ADN Soja (ng)	ADN Soja RR (ng)
1	100,0	200,0	20,0
2	33,33	66,66	6,67
3	11,11	22,22	2,22
4	3,70	7,40	0,74
5	1,23	2,46	0,25
6	0,411	0,82	0,08
7	0,137	0,274	0,03

A amplificação para o gene de referência endógeno da soja, e para a sequência específica do evento RR foi realizada em reações paralelas e independentes, originando 2 curvas de calibração (Figuras 19 a 22). A porcentagem em OGM foi calculada pela seguinte expressão:

$$\text{OGM (\%)} = \frac{\text{ng DNA (GM)}}{\text{ng DNA (referência)}} \times 100$$

As curvas de fluorescência e curva padrão obtidas por PCR em tempo real para amplificação do gene de referência endógeno da soja, lectina, apresentam-se nas Figuras 19 e 20, respectivamente. Considerando todos os pontos da reta (cada ponto em duplicado), obtiveram-se valores de correlação linear ($R^2=0,998$) e eficiência da reação (101,2%), dentro dos valores recomendados ($R^2 \geq 0,98$ e eficiência entre 90 e 110%) (Figura 20).

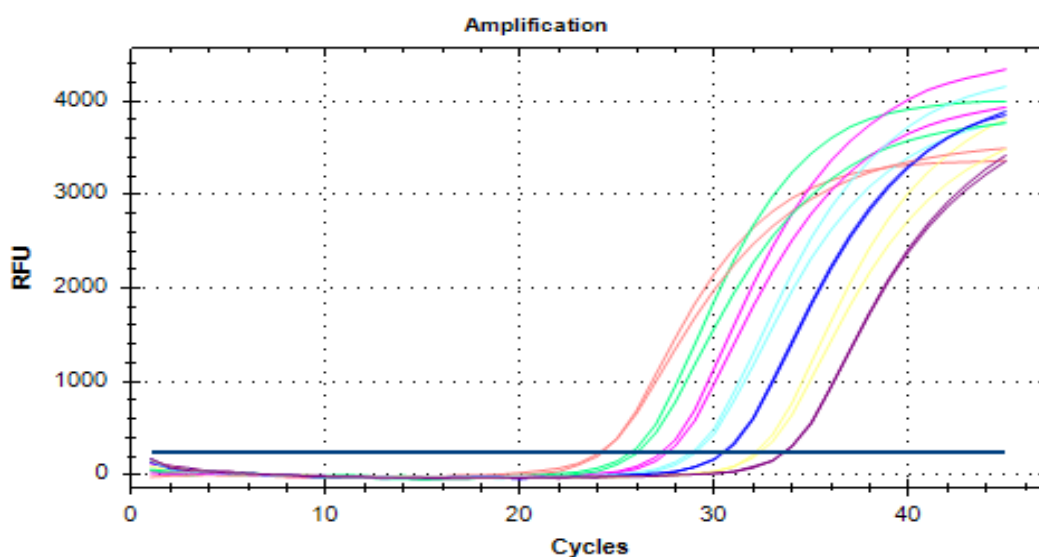


Figura 19 Representação gráfica da fluorescência (Relative Fluorescence Units) em função do número de ciclos de PCR em tempo real para o gene endógeno da soja com utilização de sondas de hidrólise do tipo Taqman™.

Pode ser observado nas Figuras 21 e 22 as curvas de fluorescência e curva padrão, respectivamente, para a amplificação específica da soja RR por PCR em tempo real. Os parâmetros do ensaio mostram-se também adequados em termos de coeficiente de correlação ($R^2=0,981$) e eficiência da PCR (99,5%) (Figura 22).

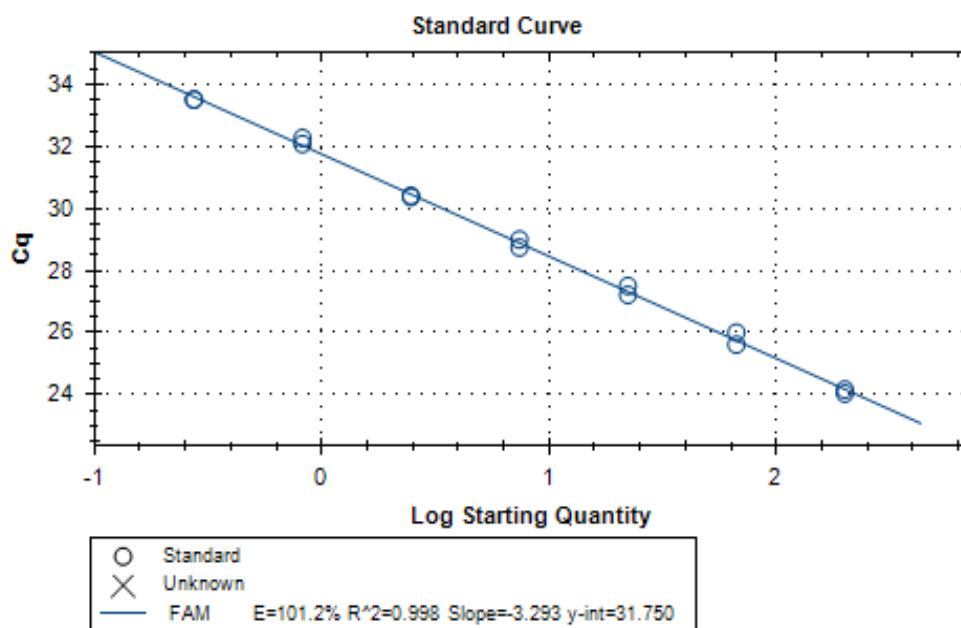


Figura 20 Curva de calibração para o gene da lectina da soja (gene endógeno) – Cycle Threshold (Ct) em função do logaritmo da quantidade de ADN.

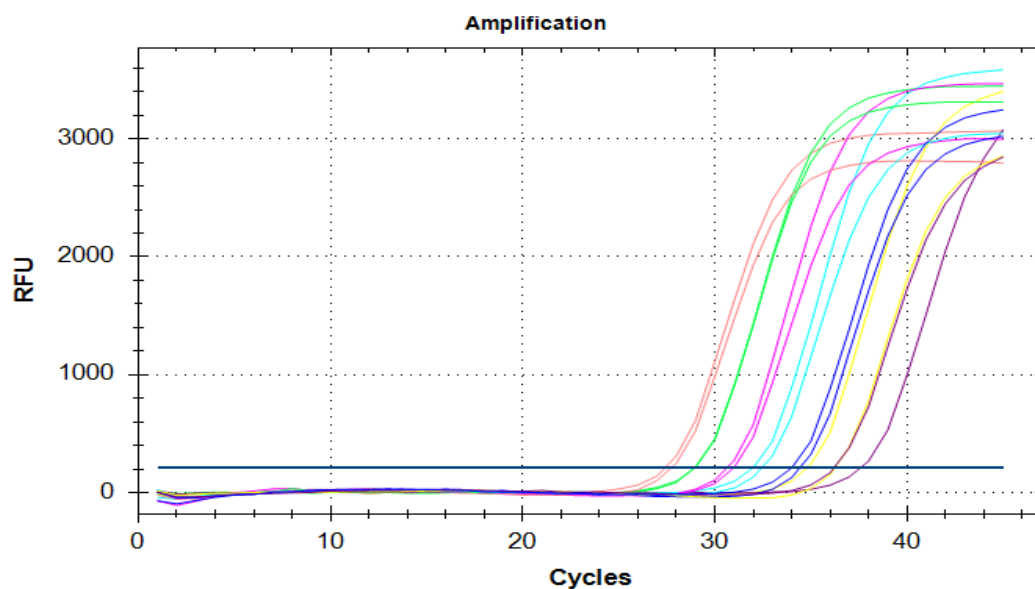


Figura 21 Fluorescência (Relative Fluorescence Units) (para duas amostras) em função do número de ciclos de PCR em tempo real para o evento RR da soja, com utilização de sondas de hidrólise do tipo Taqman™.

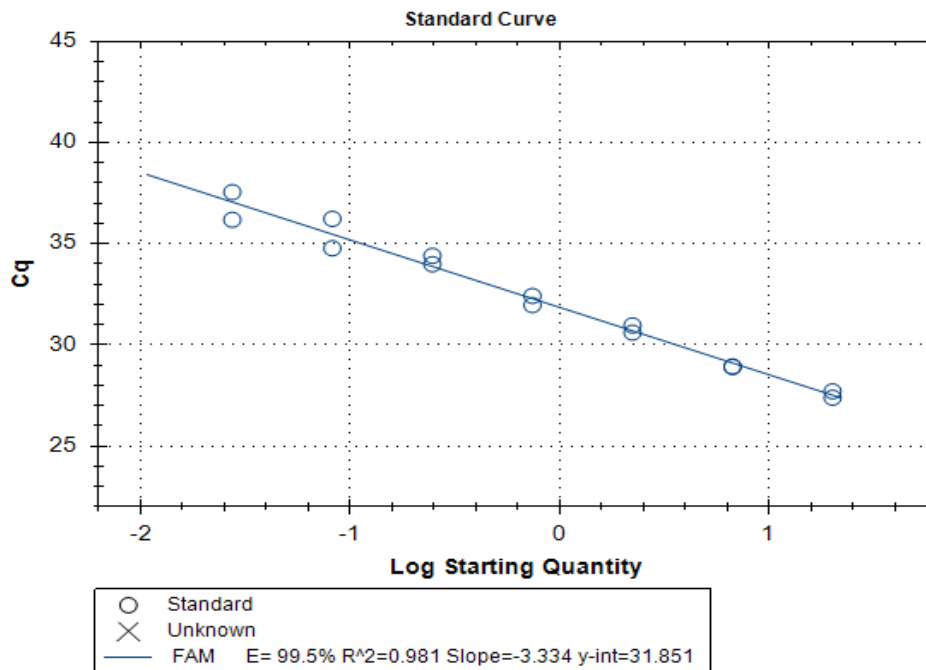


Figura 22 Curva de calibração para a soja RR – Cycle Threshold (Ct) em função do logaritmo da quantidade de ADN.

De um modo geral, os parâmetros relativos à amplificação do gene de referência e de sequências específicas para a construção do evento de soja RR foram bastante satisfatórios e muito próximos dos valores ideais. Na Tabela 12 apresentam-se os valores médios obtidos para os vários ensaios de PCR em tempo real realizados, mostrando coeficientes de correlação próximos de 1 e eficiências da PCR próximas de 100% para ambos os alvos, gene da lectina e sequência de soja RR. De acordo com o European Network of GMO Laboratories para ensaios os coeficientes de correlação deverão ser superiores a 0,98 e a eficiência da PCR deverá variar entre 90 e 110% (Mazzara *et al.*, 2008). O limite de detecção foi na ordem dos 0,03 ng de ADN de soja RR, que corresponde a cerca de 26 cópias (1 cópia de ADN de soja corresponde a 1,13 pg), determinado com base nos vários ensaios realizados, dado que todas as réplicas foram positivas.

Tabela 12 Valores médios de eficiência, correlação linear e declive das curvas de calibração obtidos para vários ensaios de PCR em tempo real.

	E (%)*	R ² *	Declive
Gene de Referência (Lectina)	102,8 ± 0,0	0,996 ± 0,002	-3,254
Evento GM (Soja RR)	101,8 ± 0,0	0,986 ± 0,005	-3,284

*valores médios de eficiência (E) e coeficiente de correlação (R²) ± desvio padrão de três ensaios

Embora os protocolos utilizados tenham sido baseados nos métodos validados publicados na ISO21570 (2005) ou em documentos do Joint Research Center, para controlo e validação interna dos métodos, quantificaram-se os materiais de referência de 1% OGM para o evento testado. Como se observa Tabela 14, a média dos valores estimados para o padrão de 1% do evento está bastante próxima do valor real esperado, o que confirma e valida o cálculo da proporção de OGM baseada na relação direta do número de cópias de ADN de soja RR (ou quantidade, ng) em relação ao número de cópias do gene de referência (ou quantidade, ng). A Tabela 13 apresenta ainda os resultados da percentagem do evento RR nas amostras comerciais. As 6 amostras positivas para o evento de soja RR, em PCR qualitativa, foram todas confirmadas por PCR em tempo real. Conforme se pode verificar, os cinco dos valores obtidos encontraram-se abaixo do limite requerido pela legislação (0,9%), mostrando que a presença de OGM não precisa ser rotulada nestes casos. No entanto, uma amostra (SJ189) revelou ter um conteúdo de 21% de soja RR, mostrando que foi produzida a partir de soja RR e que como tal deveria estar rotulada. Deste modo, de todas as amostras que permitiram a obtenção de ADN de soja amplificável, uma apresentou-se não conforme com a rotulagem.

Tabela 13 Resumo geral dos resultados obtidos por PCR qualitativa e PCR em tempo real para a deteção da sequência endógena e específica do evento RR de soja GM em alimentos à base de soja existentes no mercado.

	Gene Endógeno (Lectina)		Evento RR de Soja		OGM (%)	
	Ct*	ADN* (ng)	Ct*	ADN* (ng)		
Material Referência Soja RR 1%	24,72 ± 0,00	122,0 ± 0,9	31,20 ± 0,21	1,48 ± 0,22	1,21	
AMOSTRAS	1	25,59 ± 0,18	64,1 ± 8,0	36,97 ± 1,46	0,040 ± 0,030	0,06
	2	26,03 ± 0,08	46,9 ± 2,7	35,30 ± 0,70	0,099 ± 0,039	0,21
	3	25,54 ± 0,04	76,9 ± 1,9	38,01 ± 0,17	0,011 ± 0,001	0,01
	4	24,32 ± 0,05	198,0 ± 6,9	36,29 ± 0,18	0,030 ± 0,010	0,02
	5	25,61 ± 0,42	67,74 ± 15,03	33,33 ± 0,01	0,26 ± 0,00	0,39
	6	31,92 ± 0,29	0,899 ± 0,170	33,69 ± 0,25	0,21 ± 0,03	21,0

*Valores médios ± desvio padrão.

Relativamente aos resultados dos estudos interlaboratoriais, de 2014, 3 das 4 amostras revelaram-se positivas para a presença de soja RR e a sua quantificação apresentou valores muito próximos das médias obtidas pelos laboratórios que participaram no estudo (Tabela 14). Realça-se ainda que os resultados do presente trabalho se encontraram dentro do

intervalo requerido de Z score. Em 2015, as amostras alvo do estudo para a soja RR foram 2, e apenas uma se revelou positiva para a soja RR. Os resultados da quantificação encontram-se em análise por parte da entidade responsável pelo estudo interlaboratorial, pelo que ainda não possível comparar o resultado com o esperado (Tabela 15).

Tabela 14 Resultados obtidos por PCR em tempo real para a amplificação do gene da lectina e sequência específica do evento RR em amostras de estudos interlaboratoriais.

Amostra	Gene Endógeno (Lectina)		Evento RR de Soja		OGM (%)	
	Ct*	ADN* (ng)	Ct*	ADN* (ng)	Estimado	Média dos laboratórios**
S.2014.4.1.	22,37 ± 0,01	329,0 ± 16,5	29,48 ± 0,09	267,0 ± 0,16	0,83	0,86
S.2014.4.2.	22,26 ± 0,05	341,0 ± 13,3	30,32 ± 0,15	150,0 ± 0,14	0,44	0,65
S.2014.4.3.	22,96 ± 0,18	206,3 ± 28,3	31,24 ± 0,10	0,803 ± 0,05	0,37	0,45
S.2014.4.4.	22,38 ± 0,04	314,3 ± 33,6	-	-	-	-
S.2015.4.2.	25,45 ± 0,09	70,6 ± 4,4	32,58 ± 0,19	0,606 ± 0,080	0,86	***

*Valores médios ± desvio padrão. **Valores médios obtidos por todos os laboratórios que entrar nos referidos estudos interlaboratoriais.*** Ensaio ainda a decorrer.

Em geral, os resultados de PCR em tempo real demonstraram que não existiram falsos positivos provenientes da análise por PCR qualitativa, dado que todas foram quantificadas. Na Tabela 15, apresenta-se um resumo dos resultados de PCR qualitativa e quantitativa para todas as amostras analisadas, onde se pode verificar que as amostras positivas para a soja RR foram maioritariamente farinhas e massas. Quanto aos resultados positivos para o gene eucariota (17) que foram negativos para a lectina, mostram a ausência de soja e não conformidade da rotulagem quanto à sua presença declarada.

Tabela 15 Resumo dos resultados de deteção qualitativa da soja RR nas amostras analisadas, incluindo a deteção dos genes de referência e universal.

Amostras	Gene da lectina da soja	Gene Universal Eucariotas	Soja RR	OGM (%)
Bebidas/ logurtes (n=29)	26	2	1	0,06
Farinhas/ massas (n=11)	10	3	3	0,21 0,01 0,39
Bolachas (n=14)	10	3	-	-
Produtos tipo Carne (n=25)	21	4	1	0,02
Outros (n=12)	5	6	1	21,0
Total (n=91)	72	18	6	-

2.3 Conclusão

A produção e consumo de alimentos GM ou seus derivados têm vindo a aumentar, contínua e exponencialmente ao longo das últimas décadas. Os riscos que daí podem advir são bastante focados pelas autoridades competentes, como a AESA. Como consequência da globalização e dos avanços da ciência, o consumidor é constantemente confrontado com uma infinidade de novos e variados produtos alimentares, que muitas vezes são provenientes de locais longínquos ou são resultado do progresso biotecnológico. É neste grupo que se incluem os alimentos GM e seus derivados. Sendo este tipo de alimentos passíveis de provocar efeitos nocivos na saúde humana e animal, no ambiente e na biodiversidade, foi elaborada legislação específica de forma a proteger a saúde humana e o ambiente. Para além da legislação contemplar a obrigatoriedade de um processo exaustivo de avaliação dos riscos para a saúde e ambiente, dá também o direito ao consumidor de uma escolha informada quanto à presença de OGM nos alimentos. Essa escolha informada relaciona-se com a obrigatoriedade da rotulagem dos alimentos contendo proporções de OGM acima de 0,9%. Assim, o desenvolvimento e melhoramento de técnicas para deteção e quantificação da presença OGM nos produtos disponíveis no mercado é fundamental. Sendo a soja a principal cultura GM, a sua deteção é então de especial relevância nos alimentos.

Deste modo, com o objetivo de verificar a conformidade com a rotulagem de alimentos disponíveis comercialmente quanto à presença de soja GM, desenvolveram-se e aplicaram-se métodos para a deteção e quantificação de soja RR. Para tal, extraiu-se o ADN com sucesso de 91 amostras comerciais, incluindo materiais de referência certificados para desenvolvimento e otimização de métodos de PCR e materiais provenientes de estudos interlaboratoriais para a sua validação. A amplificação por PCR do gene de lectina da soja mostrou que foi possível obter ADN amplificável de soja em 80% das amostras comerciais, apesar do elevado nível de processamento da grande maioria dos alimentos. Para verificar se os extratos que não apresentavam resultado positivo para a soja, possuíam ADN amplificável, procedeu-se a um ensaio de PCR com alvo num gene universal eucariota que permitiu verificar que cerca de 95% desses extratos continham ADN amplificável, mostrando a sua não conformidade com a rotulagem quanto à presença de soja como ingrediente. A amplificação por PCR com *primers* específicos da soja RR permitiu a sua deteção até 0,1%, por otimização com os materiais de referência certificados, permitindo a identificação soja RR em 6 amostras comerciais, o que corresponde a 8,3% das amostras positivas para a soja.

Dos estudos interlaboratoriais de 2014, 3 das quatro amostras revelaram a presença de soja RR e nos dois materiais de 2015, 1 das duas amostras também revelou esta presença.

Para confirmação e quantificação dos resultados qualitativos quanto à presença de soja RR, foi desenvolvida e otimizada com sucesso uma metodologia de PCR em tempo real através do método da dupla curva de calibração, utilizando sondas de hidrólise do tipo TaqMan. Os parâmetros do método mostraram a sua adequação para a quantificação de soja RR uma vez que os coeficientes de correlação das curvas foram superiores a 0,98 e as eficiências de PCR situaram-se entre 90 e 110%, sendo próximas do valor ideal de 100%. A aplicação do ensaio de PCR em tempo real permitiu confirmar os 6 resultados positivos para a soja RR, mostrando que uma das amostras continha 21% de soja RR sem estar rotulada, enquanto as restantes apresentavam teores deste evento que variaram entre os 0,01% e os 0,39%. Assim, uma das amostras não se apresentava conforme a rotulagem quanto à presença de OGM.

Quanto aos resultados do estudo interlaboratorial de 2014, as 3 amostras positivas para soja RR foram confirmadas e os valores obtidos, em comparação com as médias de todos os laboratórios que participaram no estudo, mostraram a proximidade dos resultados estimados no presente trabalho com os esperados e que os valores estimados se encontravam dentro do intervalo de Z score desejável. Relativamente ao estudo interlaboratorial de 2015, efetuou-se a quantificação na amostra que revelou a presença de soja RR, tendo sido o resultado já enviado, mas ainda se encontra em fase de análise.

Realmente a presença de OGM é uma realidade que não se pode evitar pelo que deve ser alvo de estudo e desenvolvimento constante para que seja mantido um elevado nível de segurança relativamente a eles. Já muito se avançou nesta área, mas não é de todo suficiente, porque cada vez são mais os eventos GM autorizados e não autorizados e, portanto, é fundamental que sejam desenvolvidas metodologias capazes de os detetar, distinguir e quantificar de forma rápida, específica e expedita.

3 REFERÊNCIAS

- ABNOVA – **Innovate through Integrated solutions**
<http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7B70196CA1-59B1-40D0-8394-19F533EB108F%7D> (último acesso a 01-07-2015).
- AGÊNCIA PORTUGUESA DO AMBIENTE, MINISTÉRIO DO AMBIENTE E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO (2015) -
<http://www.apambiente.pt/POLITICASAMBIENTE/BIOTEC/Paginas/default.aspx> (último acesso a 02-07-2015).
- AHMED, F.E. **Protein-Based methods: Elucidation of the Principles**. In F.E. Ahmed (Ed), *Testing of Genetically Modified Organisms in Foods* (pp. 117-146). Food Products Press, (2004), New York.
- ARYA, M., SHERGILL, I.S., WILLIAMSON, M., GOMMERSALL, L., ARYA, N., PATEL H.R.: **Basic principles of real-time quantitative PCR**. *Expert Rev Mol Diagn* **5**(2), (2005), 209-219.
- BATISTA, R., OLIVEIRA, M.M. **Facts and fiction of genetically engineered food**. *Trends in Biotechnology* **27** (2009), 277-286.
- BENBROOK, C. M., **Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S. – the first sixteen years**, Benbrook Environmental Sciences Europe 2012, 24:24 Disponível em <http://www.enveurope.com/content/24/1/24> (último acesso a 02/07/2015)
- BEYER, P., AL-BABILI, S., YE, X., LUCCA, P., SCHAUB, P., WELSCH, R., POTRYKUS, I. **Golden rice: Introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency**. *The Journal of nutrition*, **132**(3) (2002), 506S-510S.
- BEYER, P. **Golden Rice and 'Golden' crops for human nutrition**. *New Biotechnology* **27**, (2010), 478-481.
- BROLL, H. **Polymerase Chain Reaction**. In: POPPING B, DIAZ-AMIGO C, HOENICKE K, (Eds.) **Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists**. Hoboken: John Wiley & Sons, (2010) p. 41-58.
- CANHOTO, J.M. **Biotecnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

- CEDERROTH, C.R., NEF, S. **Soy, phytoestrogens and metabolism: A review.** *Mol Cell Endocrinol*, **304** (2009), 30-42.
- CHRISPEELS, M.J., & SADAVA, D.E. **Plants, Genes and Crop Biotechnology.** Second Edition. [S.l.] : Jones and Bartlett Publishers, 2003.
- CONCEIÇÃO, F., MOREIRA, A., BIENFIELD, P.C. **Deteção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares,** *Ciência Rural* 36 (2006) n. 1.
- COSTA, J., MAFRA, I., AMARAL, J.S., OLIVEIRA, M.B.P.P. **Detection of genetically modified soybean DNA in refined vegetable oils.** *European Food Research and Technology*, **230** (2010), 915-923.
- COSTA, J., OLIVEIRA, M.B.P.P., MAFRA, I. **Effect of thermal processing on the performance of the novel single-tube nested real-time PCR for the detection of walnut allergens in sponge cakes.** *Food Research International* 54 (2013), 1722-1729.
- D'AGNOLO, G. **GMO: Human health and risk assessment.** *Veterinary Research Communications* **29** (2005), 7-11.
- DI PINTO, A., FORTE V., GUASTADISEGNI, M.C., MARTINO, C., SCHENA, F.P., TANTILLO, G. **A comparison of ADN extraction methods for food analysis.** *Food Control* **18** (2007), 76-80.
- Directiva 2001/18/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de Março de 2001 **relativa à libertação no ambiente de organismos geneticamente modificados** e que revoga a Directiva 90/220/CEE do Conselho, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 106, 1-38.
- ENGEL, K.-H., MOREANO, F., EHLERT, A., BUSCH, U. **Quantification of ADN from genetically modified organisms in composite and processed foods.** *Trends in Food Science & Technology* **17** (2006), 490-497.
- ESTORNINHO, M.J. **Segurança alimentar e protecção do consumidor de organismos geneticamente modificados.** Almedina, 2008.
- FORTE, V.T., DI PINTO, A., MARTINO, C., TANTILLO, G.M., GRASSO, G., SCHENA, F.P. **A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize.** *Food Control* **16** (2005), 535-539.
- GARCIA-CAÑAS, V., CIFUENTES, A., GONZÁLEZ, R. **Detection of genetically**

- modified organisms in foods by ADN amplification techniques.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44** (2004a), 425-436.
- GARCIA-CAÑAS, V., CIFUENTES, A., GONZALEZ, R. **Quantitation of transgenic Bt event-176 maize using double quantitative competitive polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis laser-induced fluorescence.** *Analytical Chemistry* **76** (2004b), 2306-2313.
- GARCIA-CAÑAS, V., GONZALEZ, R., CIFUENTES, A.. **Sensitive and simultaneous analysis of five transgenic maize using multiplex polymerase chain reaction, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence.** *Electrophoresis* **25**, (2004), 2219-2226.
- GIOVANNINI, T., CONCILIO, L. **PCR detection of genetically modified organisms in foods by ADN amplification techniques: A review.** *Starch-Stärke* **54** (2002), 321-327.
- GMO COMPASS (2015) - <http://www.gmo-compass.org/eng/home/> (último acesso a 02-07-2015).
- GM CROP Database. **Center for Environmental Risk Assessment (CERA)** - <http://cera-gmc.org/GmCropDatabaseEvent/GTS%2040-3-2> (último acesso a 02-07-2015).
- GRIFFITHS, A.J., MILLER, J.H., SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R.C., & GELBART, W.M. **Introdução à Genética** - Sexta Edição, (1998), Guanabara Koogan.
- GRYSON, N., MESSENS, K., DEWETTINCK, K. **PCR detection of soy ingredients in bread.** *European Food Research and Technology* **227** (2007), 345-351.
- GRYSON, N. **Effect of food processing on plant ADN degradation and PCR-based GMO analysis: a review.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396** (2010), 2003-2022.
- GUIDANCE Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed, *the EFSA Journal* **99** (2006), 1-100.
- HERNANDEZ, M., RODRIGUEZ-LAZARO, D., ZHANG, D., ESTEVE, T., PLA, M., PRAT, S. **Interlaboratory transfer of a PCR multiplex method for simultaneous detection of four genetically modified maize lines: Bt11, MON810, T25, and GA21.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (2005), 3333-3337.
- HOLST-JENSEN, A., RØNNING, S.B., LØVSETH, A., BERDAL, K.G., **PCR technology for**

- screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs).** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **375** (2003), 985-993.
- HOLST-JENSEN, A. **Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives.** *Biotechnology Advances*, **27** (2009), 1071-1082.
- HOLST-JENSEN, A., BERTHEAU, Y., DE LOOSE, M., GROHMANN, L., HAMELS, S., HOUGS, L., WULFF, D. **Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials.** *Biotechnology advances*, **30** (2012), 1318-1335.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO21569 (2005) **Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Qualitative nucleic acid based methods**, Switzerland.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO21570 (2005) **Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Quantitative nucleic acid based methods**, Switzerland.
- INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS (ISAAA) - <http://www.isaaa.org/> (ultimo acesso a 02-07-15).
- JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014.** ISAAA Brief No. 49 (2014) ISAAA: Ithaca, New York.
- 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* **82**, (1999), 923-928.
- MAFRA, I., OLIVEIRA, M.B.P.P. **Organismos geneticamente modificados e alimentos derivados: II. Métodos de detecção e quantificação.** *Alimentação Humana* **11** (2005), 71-89.
- MAFRA, I., FERREIRA, I.M.P.L.V.O., OLIVEIRA, M.B.P.P. **Food authentication by PCR-based methods.** *European Food Research and Technology* **227** (2008a), 649-665.
- MAFRA, I., SILVA, S.A., MOREIRA, E.J.M.O., SILVA, C.S.F.S., OLIVEIRA, M.B.P.P. **Comparative study of ADN extraction methods for soybean derived food products.** *Food Control* **19** (2008b), 1183-1190.
- MAFRA, I. (2011) **Current methods for detecting genetically modified organisms in foods.** In M.B.P.P. OLIVEIRA, I. MAFRA, J.S. AMARAL (Eds) *Current topics on food*

- authenticity (pp. 211-236). Transworld Research Network, Kerala, India.
- MARMIROLI, N., MAESTRI, E., GULLI, M., MALCEVSCHI, A., PEANO, C., BORDONI, R., DE BELLIS, G.. **Methods for detection of GMOs in food and feed.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392, (2008), 369-384.
- MANZANARES-PALENZUELA, C.L., MARTÍN-FERNÁNDEZ, B., SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ, M., LÓPEZ-RUIZ, B. **Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 66 (2015), 19-31.
- MATEOS-APARICIO, I., REDONDO CUENCA, A., VILLANUEVA-SUAREZ, M.J., ZAPATA-REVILLA, M.A. **Soybean, a promising health source.** *Nutr Hosp*, **23**(4), (2008).
- MAZZARA, M., SAVINI, C., CHARLES DE DELOBEL, C., BROLL, H., DAMANT, A., PAOLETTI, C., VAN DEN EEDE, G. **European Network of GMO Laboratories (ENGL). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing,** European Commission: Brussels, (2008). Disponível online em: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm> (último acesso em 02-07-2015)
- NATARAJAN, S., LUTHRIA, D., BAE, H., LAKSHMAN, D., MITRA, A. - **Transgenic soybeans and soybean protein analysis: an overview.** *Journal of agricultural and food chemistry*. 61, 48 (2013), 11736-11743.
- NATONEK-WIŚNIEWSKA, M., KRZYŚCIN, P., PIETRZYŃSKA-KAJTOCH, A. **The species identification of bovine, porcine, ovine and chicken components in animal meals, feeds and their ingredients, based on COX I analysis and ribosomal DNA sequences.** *Food Control* **34** (2013), 69-78.
- NELSON, D.L., COX, M.M. **DNA-Based Information Technologies.** In D. L. Nelson, M.M. Cox (Eds) *Lehninger Principles of Biochemistry* (pp. 306-342), (2005), 4th Edition, Freeman, USA.
- NOAA: NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION - <http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/04etta/background/dna/dna.html> (último acesso em 02-07-2015).
- PADGETTE, S.R., TAYLOR, N.B., NIDA, D.L., BAILEY, M.R., MACDONALD, J., HOLDEN, L.R.; FUCHS, R.L. **The Composition of Glyphosate-Tolerant Soybean Seeds Is Equivalent to that of Conventional Soybean;** *Journal of Nutrition*; **126** (3) (1996), 702-716.

- PANSIOT, J., CHAOUACHI, M., CAVELLINI, L., ROMANIUK, M., AYADI, M., BERTHEAU, Y., LAVAL, V. **Development of two screening duplex PCR assays for genetically modified organism quantification using multiplex real-time PCR master mixes.** *European Food Research and Technology* **232** (2011), 327-334.
- PATISAUL, H.B., JEFFERSON, W. **The pros and cons of phytoestrogens.** *Front Neuroendocrinol*, **31** (2010), 400-19.
- PELLETIER, D.L. **FDA's regulation of genetically engineered foods: Scientific, legal and political dimensions.** *Food Policy* **31** (2006), 570-591.
- PESTANA, E. **Real-Time PCR – The Basic Principles.** In: PESTANA, E., BELAK, S., DIALLO, A., CROWTHER J.R., VILTOEN, G.J., Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics – real time PCR applications. Springer Science & Business Media, 2010.
- QUERCI, M., VAN DEN BULCKE, M., VAN DEN EEDE, G., BROLI, H. **New approaches in GMO detection.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396** (2010), 1991-2002.
- RASFF FOR SAFER FOOD — **The Rapid Alert System for Food and Feed — 2014 annual report.** *European Commission - Health and Food Safety – 2015.*
- REGULAMENTO (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios.
- REGULAMENTO (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.º 1924/2006 e (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) N.º 608/2004 da Comissão Texto relevante para efeitos do EEE.
- REGULAMENTO (CE) N.º 1829/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003 relativo a géneros alimentícios e alimentos para animais geneticamente modificados, *Jornal Oficial da União Europeia*, 18-10-2003 L 268 I-23.
- REGULAMENTO (CE) N.º 1830/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003 relativo à rastreabilidade e rotulagem de organismos geneticamente

modificados e à rastreabilidade dos géneros alimentícios e alimentos para animais produzidos a partir de organismos geneticamente modificados e que altera a Directiva 2001/18/CE, Jornal Oficial da União Europeia, 18-10-2003 L 268 24-28.

- RUDI, K., RUD, I., HOLCK, A. **A novel multiplex quantitative ADN array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed.** *Nucleic Acids Research* **31**, (2003), 62.
- SHRESTHA, H.K., HWU, K.K., WANG, S.J., LIU, L.F., CHANG, M.C. **Simultaneous detection of eight genetically modified maize lines using a combination of event- and construct-specific multiplex-PCR technique.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, (2008), 8962-8968.
- SCHUBBERT, R. **Molecular Biology Laboratory Layout.** In: POPPING, B., DIAZ-AMIGO, C. & HOENICKE, K. *Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists.* Place: John Wiley & Sons, (2010), 3-40.
- SOMMA, M. **Extraction and purification of DNA.** *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms (Session 4).* European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection, (2006) Italy.
- THE WORLD OF FOOD SCIENCE – **Surveillance of Genetically Modified Plants in Food, Feed and Seed.** <http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1003869> (último acesso a 02-07-15).
- TRAILL, W. B., JAEGER, S. R., YEE, W. M., VALLI, C., HOUSE, L. O., LUSK, J. L. - **Categories of GM Risk-Benefit Perceptions and Their Antecedents.** *AgBioForum.* **7:4** (2004) 176-186.
- TRAPMANN, S.; CORBISIER, P.; SCHIMMEL, H.; EMONS, H. **Towards future reference systems for GM analysis.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396** (2010), 1969-1975.
- VIDEIRA, ARNALDO - **Engenharia Genética - Principios e Aplicações.** 2a Edição ed. [S.l.]: LIDEL - Edições Técnicas, 2011.
- WEIGHARDT, F. **Quantitative PCR for the Detection of GMOs.** *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms (Session 10).* European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection, (2006) Italy.