

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

AMANDA ROCHA PIETROCHINSKI

JULLIE ANGEL RUTHS

**DIAGNÓSTICO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS
EM FARINHAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ponta Grossa

2014

Amanda Rocha Pietrochinski

Jullie Angel Ruths

Diagnóstico de Organismos Geneticamente Modificados em Farinhas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Vitória Messias Bittencourt

Ponta Grossa

2014



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa
Diretoria de Graduação e Educação profissional
Tecnologia em Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

DIAGNÓSTICO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS EM FARINHAS

por

AMANDA ROCHA PIETROCHINSKI

JULLIE ANGEL RUTHS

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 09 de dezembro de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnóloga em Alimentos. As candidatas foram arguidas pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Juliana Vitória Messias Bittencourt
Prof.(a) Orientador(a)

Prof^o.Msc. Luiz Alberto Chaves Ayala
Membro titular

Prof^o Dr^o Luciano Medina Macedo
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso -

RESUMO

PIETROCHINSKI, Amanda Rocha; RUTHS, Jullie Angel. **Diagnóstico de Organismos Geneticamente Modificados em Farinhas**. 2014. 24 F. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

Com os avanços que ocorreram na biotecnologia molecular e na cadeia produtiva alimentar a utilização de organismos geneticamente modificados na produção de grãos ganharam espaço no mercado agrícola e como consequência é possível observar que a utilização dos transgênicos na produção dos alimentos processados aumentou de maneira significativa nos últimos anos. Este aumento ocorreu porque as principais matérias primas utilizadas para a produção dos alimentos processados são transgênicas, como é caso das farinhas. Os principais produtos em que é possível observar a presença de transgênicos são os que contêm milho em sua composição, seja na forma de farinha ou amido. Com o aumento da utilização dos transgênicos nos alimentos, tem-se a necessidade de avaliar técnicas que sejam capazes de indicar a presença de organismos geneticamente modificados nos alimentos, e que apresentem resultados confiáveis além de fácil aplicação. Neste sentido o presente trabalho teve como objetivo verificar a presença de organismos geneticamente modificados em amostras de farinhas de milho, através da técnica da PCR convencional. Para atingir o objetivo amostras de diferentes tipos de farinha de milho, foram submetidas à extração, amplificação em sistema de PCR convencional e visualização do DNA; também foi realizado teste de sensibilidade para verificar a eficiência da técnica de PCR convencional. Com os resultados obtidos conclui-se que com a PCR convencional é possível avaliar a presença de ogm's nos alimentos, no entanto há casos que se tem a necessidade de utilizar técnicas mais sensíveis como a PCR em tempo real, que permite analisar de forma quantitativa a presença de transgênicos nos produtos.

Palavras Chaves: Diagnóstico Molecular. Milho. Farinhas. PCR Convencional. Transgênicos.

ABSTRACT

PIETROCHINSKI, Amanda Rocha; RUTHS, Jullie Angel. **Diagnosis Genetically Modified Organisms in Flour**. 2014. 24 F. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

With the advances that have occurred in molecular biotechnology and food production chain the use of genetically modified organisms in grain production gained ground in the agricultural market and as a result you can see that the use of transgenic in the production of processed foods has increased significantly in recent years. This increase occurred because the main raw materials used for the production of processed foods are transgenic, as is the case of flour. The main products in which it is possible to observe the presence of transgenic are those containing corn in its composition, whether in the form of flour or starch. With the growing use of transgenic in foods has been the need to evaluate techniques that are able to indicate the presence of genetically modified organisms in food and that exhibit reliable results as well as easy application. In this sense the present work was to verify the presence of genetically modified organisms in samples of corn flour by conventional PCR. To achieve the objective of different samples of corn flour were extracted, in conventional PCR amplification and DNA visualization system; was also performed sensitivity test to check the efficiency of conventional PCR. With these results it is concluded that with the conventional PCR it is possible to evaluate the presence of transgenic in food, however there are cases that have the need for more sensitive techniques such as real-time PCR, which allows to analyze quantitatively the presence of transgenic in products.

Key Words: Molecular Diagnostics. Corn. Flour. Conventional PCR. Transgenic.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Deus, por ter nos proporcionado coragem, força e a oportunidade de termos completado esse desafio.

Agradecemos à nossa família que nos deu todo o apoio e incentivo necessários nessa caminhada.

Agradecemos à Prof^a Dr^a Juliana Vitoria Messias Bittencourt pela oportunidade, ensinamentos e orientação nesse momento grandioso da nossa vida.

Agradecemos à todos os professores e colegas que contribuíram de forma direta ou indireta para nossa pesquisa.

LISTA DE SIGLAS

OGM	Organismos Geneticamente Modificados
DNA	Ácido desoxirribonucléico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
CTAB	Ácido etilenodiaminotetracético
CIA	Clorofórmio / Álcool Isoamílico
TE	Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM com pH 8,0
TBE	Tris borato EDTA
RNA	Ácido Ribonucléico
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitro
V	Volt
Rpm	Rotação por minuto
°C	Graus Centrígrados
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1 AMOSTRAS	13
2.2 MÉTODOS	13
2.3 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO DNA DAS AMOSTRAS	14
2.4 VISUALIZAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO	15
2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	15
2.6 VISUALIZAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO	16
2.7 TESTE DE SENSIBILIDADE	16
2.8 CONTROLE POSITIVO	16
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 VISUALIZAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO	20
3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE	21
4 CONCLUSÃO.....	22
4 REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento dos alimentos transgênicos ocorreu devido avanços e inovações que ocorreram na área da biotecnologia, permitindo desta maneira o desenvolvimento das técnicas de transformações de células vegetais e obtenção de novos conhecimentos relacionados aos genes resultando assim na produção de novas matérias-primas alimentares, com suas características alteradas através da transformação genética, as quais são denominadas organismos geneticamente modificados. A principal função das transformações genéticas é tornar a planta mais tolerante a herbicidas, resistentes a diferentes climas e enriquece-las nutricionalmente¹.

Os chamados Organismos Geneticamente Modificados (OGM) são organismos cujo material genético foi alterado através da engenharia genética, com a inserção de um DNA recombinante no genoma da planta. As principais razões para executar essa técnica é aumentar a produtividade para atender a grande demanda de alimentos que tem apresentado elevada crescimento nos últimos anos².

Como consequência do desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, observou-se a alteração da cadeia produtiva alimentar, pelo fato de que o uso de grãos transgênicos para a produção de alimentos processados ganhou espaço no mercado, tornando-se comum à produção de alimentos geneticamente modificados³.

Com o aumento da utilização de grãos transgênicos para produção de alimentos, a legislação brasileira por meio do Decreto 4.680 de 24 de abril de 2003 determinou que alimentos com mais de 1% de organismos geneticamente modificados em sua formulação, devem indicar a presença do mesmo no seu rótulo, para que o consumidor esteja ciente que produto que esta consumindo possui transgênicos em sua formulação².

A principal espécie de planta transgênica inserida na cadeia produtiva de alimentos é o milho que é utilizado como matéria prima para vários produtos, como fubá, amido de milho, canjica, quirera e farinha de milho⁴. O milho geneticamente modificado é chamado de milho BT, é assim denominado pelo fato de que possui atividade inseticida, devido à presença de uma toxina da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt)⁵. A presença desta toxina deve-se ao fato de que se adiciona a planta do milho genes específicos da bactéria *Bacillus thuringiensis*, tornado assim a planta resistente a certos tipos de insetos.

O uso de milho Bt resultou em uma redução dos custos de aplicação de inseticidas, oferecendo também segurança na sua utilização além de eficiência, proteção e preservação de inimigos naturais⁶.

A aprovação do plantio de cultivares de milho transgênico no Brasil ocorreu no ano de 2012, sendo que no mesmo ano doze variedades de produtos com milho transgênico em sua composição foram aprovados para a comercialização no país⁷.

Com esse aumento surgiu a necessidade de desenvolver técnicas capazes de detectar a presença de OGM'S nos alimentos processados. As técnicas de detecção e quantificação de transgênicos tem grande importância, pelo fato dos alimentos transgênicos estarem presentes de maneira mais frequente no dia a dia dos consumidores, sendo assim observa-se a necessidade de verificar se a legislação em relação à rotulagem desses alimentos tem sido respeitada pelas indústrias alimentícias⁸.

Para a análise da presença de transgênicos pode-se utilizar diversas metodologias sendo elas baseadas em detecção de proteínas, testes enzimáticos, cromatográficos e análises via PCR.

Os métodos baseados na detecção de proteínas tem como princípio a detecção de proteínas recombinantes, esses métodos têm como característica explorar a capacidade de interação entre antígeno e anticorpo. Entre os baseados na detecção de proteínas, os que apresentam mais precisão nos resultado é o ELISA e o Teste da Tira de Fluxo Lateral. Esses métodos são utilizados para analisar produtos *in natura*, devido a necessidade de manter a estrutura da proteína presente na amostra a ser analisada⁹.

A detecção de proteínas também pode ser realizada utilizando o método conhecido como Western Blot, em que se solubiliza e separa em componentes a amostra, seguida da imobilização das proteínas em uma membrana imersa numa solução com anticorpos, com a função reconhecer a proteína alvo¹⁰.

Conforme estudos os métodos baseados na detecção de proteínas não apresentam grande sensibilidade, pois durante o processamento dos alimentos tem-se a desnaturação das proteínas presentes, e a eficiência e sensibilidade da técnica varia de acordo com o tipo e grau de processamento ao qual o produto é submetido¹¹.

Os métodos enzimáticos são uma nova maneira para identificar organismos geneticamente modificados através da atividade da peroxidase na amostra, atuando como um termômetro das atividades fisiológica das plantas¹².

Com os métodos cromatográficos pode-se realizar a detecção de compostos químicos, proteicos e de produtos geneticamente modificados. A espectrometria é uma análise complementar ao método cromatográfico, utilizada para identificar compostos desconhecidos².

A espectrometria apresenta elevada sensibilidade, podendo identificar pequenas quantidades de compostos, como identificar Organismos Geneticamente Modificados em concentrações de fentoescala (uma parte em 10^{12})².

Também é possível realizar a análise da presença de transgênicos em alimentos processados ou não utilizando a biotecnologia molecular, através do método de PCR que é a chamada reação da polimerase em cadeia. Método que consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA, sendo muito sensível, específico, seguro e capaz de distinguir os diferentes genes presentes no produto².

Através da PCR é possível fazer a amplificação de pequenas quantidades de DNA, e obter resultados confiáveis, rápidos e de forma eficaz. Porém quando as amostras que se pretendem analisar passaram por um grande número de processamento, incluindo o tratamento térmico, é possível que se tenha dificuldades para a visualização do DNA, devido o fato de que quando o alimento é submetido a altas temperaturas pode ocorrer a desnaturação do mesmo¹³. Sendo assim é indicado a sua utilização para análise de produtos que são submetidos a poucos tratamentos térmicos.

Para minimizar a dificuldade, tem-se a PCR em tempo real, uma técnica que tem a capacidade de gerar resultados quantitativos. Nessa metodologia é possível fazer o acompanhamento da reação em todas as etapas da análise de forma precisa e rápida, em relação à PCR convencional onde somente são obtidos resultados qualitativos²⁰.

Diante dos aspectos analisados o trabalho teve como objetivo verificar a presença de organismos geneticamente modificados em amostras de farinhas de milho, através da técnica de PCR convencional, para posteriormente analisar a sensibilidade da técnica da PCR convencional em diferentes concentrações de produto transgênico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Para verificar a presença de milho transgênico nas amostras de farinha, foi estabelecido inicialmente um padrão de identificação positivo (controle). Este controle positivo foi obtido a partir da extração de farinha de milho transgênica, feita no Laboratório de Bioengenharia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ponta Grossa.

Para obter-se o controle positivo foram analisadas cinco tipos de farinhas de milho identificadas como transgênicas em seu rótulo, as quais foram identificadas da seguinte maneira: amostra 1 farinha de milho flocada, amostra 2 farinha de milho biju marca A, amostra 3 flocos de milho cozido, amostra 4 farinha de milho biju marca B e amostra 5 farinha de milho biju marca C.

Também analisou-se cinco amostras de produtos com farinha de milho em sua composição, sendo essas amostras identificadas da seguinte maneira: amostra 1 mistura para bolo de chocolate, amostra 2 mistura para bolo de milho, amostra 3 cereal marca A, amostra 4 cereal marca B e amostra 5 sêmola de milho.

Todas as amostras utilizadas para as análises foram adquiridas em mercados da região de Ponta Grossa e escolhidas de forma aleatória. Também foi utilizada uma amostra controle positivo nas análises.

Para o teste de sensibilidade da técnica foi utilizado amostras com as seguintes concentrações: 20%, 40%, 60%, 80% e 100% de farinha de milho transgênica. As amostras para o teste de sensibilidade foram preparadas com farinha de milho transgênica e farinha de trigo, no laboratório de Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ponta Grossa, sendo cada uma com 50g.

2.2 MÉTODOS

Para estabelecer o controle positivo, e realizar as análises dos produtos preparados e do teste de sensibilidade todas as amostras foram submetidas ao processo de extração, isolamento, amplificação e visualização do DNA presente.

A extração é aplicada para a separação e concentração do produto desejado. Para que a extração e a purificação do produto possam ocorrer com eficiência, são utilizados solventes, detergentes, enzimas e operações unitárias como a centrifugação.

2.3 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO DNA DAS AMOSTRAS

A extração das amostras foi realizada a partir do protocolo publicado por Mazza e Bittencourt (2000)¹⁴, que se inicia com a maceração de 0,5g da amostra e adição de 1000µl de tampão de extração a 2% (CTAB). Após ocorre a transferência do triturado para um microtubo de 1,5ml que é colocado em banho-maria a 65°C durante 30 minutos com agitação por inversão a cada 15 minutos. Após o banho, os tubos são resfriados em temperatura ambiente e adiciona-se 600µl de CIA (24:1) com agitação em vortex por 5 minutos. Após a agitação, os tubos são levados à centrifugação durante 5 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante gerado é transferido para um novo microtubo e segue-se com adição de 1/10 do volume da solução CTAB a 10%, com posterior agitação no vortex por 5 minutos.

Ocorre a adição de 600µl de CIA e novamente agitação do vortex por 5 minutos. Após essa etapa faz-se a centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos e transferência do sobrenadante para um novo microtubo. Segue adicionando 5µl de proteinase-K e mantém incubado sobre 30°C por 45 minutos.

A extração continua com a adição de 600µl de CIA, agitação no vortex por 5 minutos, centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm e transferência do sobrenadante para um novo microtubo. Neste é feita a adição de 2/3 do volume da solução aquosa de isopropanol gelado a -20°C e incubação a 40°C por 30 minutos. Após a incubação, os tubos são centrifugados a 13000 rpm por 5 minutos.

Segue pela eliminação do isopropanol, restando somente o pellet, que é adicionado de 1000µl de etanol gelado 70% e posterior centrifugação por 4 minutos a 13000 rpm. Eliminação do etanol e adição de 1000µl de etanol gelado 96% e centrifugação por 4 minutos a 13000 rpm. Ocorre novamente a eliminação do etanol e o pellet é seco a temperatura ambiente, e depois de seco realiza-se a sua ressuspensão em 100µl de água miliq.

2.4 VISUALIZAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

Concluída a etapa de extração, as amostras do DNA extraído foram aplicadas em gel de agarose a 1,5%, posteriormente o gel foi depositado em uma cuba de eletroforese com tampão TBE, e submetido a uma tensão elétrica de 70 V por 30 minutos em aparelho de eletroforese em gel modelo LPS 300 V. Após a realização da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio por 15 minutos, para posterior visualização sob luz ultravioleta do fragmento de DNA extraído em aparelho transiluminador UVB modelo LTD 20 X 20 HE. Esta etapa tem como objetivo observar a presença de DNA das amostras.

2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A partir do DNA isolado, foi realizada uma reação de amplificação em termociclador modelo MaxyGene Gradient. Os testes para amplificação foram realizados seguindo as recomendações descritas para detecção do promotor 35S conforme trabalho de Miranda e Boreiko (2012)¹⁵, que recomenda a adição de alguns ciclos de PCR no modo *touch-down*.

As etapas da PCR realizadas neste trabalho encontram-se descritas a seguir: desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguida de 10 ciclos no modo “*touch-down*” com desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de anelamento inicial de 67°C por 1 minuto com decréscimo de 0,5°C por ciclo até atingir 62°C após 10 ciclos, mais extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por mais 25 ciclos na temperatura de anelamento de 62°C por 1 minuto. Finalizando estes 35 ciclos, foi adicionado um ciclo de extensão de 10 minutos na temperatura de 72°C, com o objetivo de finalizar possíveis amplificações inacabadas.

As amostras de DNA isoladas foram amplificadas em um volume final da reação de 25µl, sendo 3µl de DNA e 22µl da reação preparada com os reagentes e suas respectivas concentrações como descrito na tabela 1.

Tabela 1 Concentração Dos Reagentes para PCR

Concentração Inicial	Para 1 amostra (µl)
Buffer 10X PCR	2,5
MgCl ₂ 50 mM	0,75
dNTP's 10 mM	0,8
P- 35S f 5 pmoles/µl	1,25
P- 35S r 2 5 pmoles/µl	1,25
Taq 5U/µl	0,3
DNA	3,0
Água	15,15
Volume final	25,0

Fonte: Autoria Própria

2.6 VISUALIZAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO

Concluída amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5 %, sendo o gel depositado em uma cuba de eletroforese com tampão TBE, em seguida submeteu-se o DNA a uma tensão elétrica de 110 V por 1 hora e 10 minutos em aparelho de eletroforese em gel modelo LPS 300 V. Após a realização da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio para posterior visualização sob luz ultravioleta do fragmento amplificado e análise da presença do promotor 35S nas amostras do tecido foliar e farinha de milho transgênica em aparelho transiluminador UVB modelo LTD 20 X 20 HE.

2.7 TESTE DE SENSIBILIDADE

Para realizar o teste de sensibilidade, foram preparadas 5 amostras de 50grs com as seguintes concentrações de farinha de milho transgênica: 20%, 40%, 60%, 80% e 100%., nas quais foi adicionado farinha de trigo para verificar a sensibilidade da técnica da PCR na detecção de diferentes concentrações de produto com transgênico em misturas.

2.8 CONTROLE POSITIVO

Durante o teste do melhor protocolo de extração para amostras com farinha de milho, foi realizada a obtenção de controle positivo através extração de farinha de milho pura, com apenas um ingrediente, para não interferir no resultado da análise, as amostras utilizadas foram as amostras de farinha de milho citadas anteriormente.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de extração utilizado nesse estudo mostrou-se eficaz para a extração do DNA de amostras de farinhas de milho. Na figura 1, encontra-se a foto da extração de diferentes tipos de farinhas, onde na primeira coluna o marcador de peso molecular de 100bp, e nas cinco outras colunas tem-se extração de amostras de farinha de milho flocada, farinha de milho biju, flocos de milho cozido, farinha de milho biju marca A e farinha de milho biju marca B respectivamente.

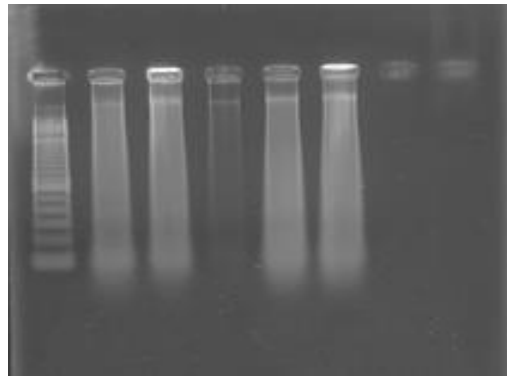


Figura 1 - Gel de agarose com o resultado da extração de DNA das amostras dispostas da seguinte forma: coluna 1 marcador molecular 100bp, coluna 2 farinha de milho flocada, coluna 3 farinha de milho biju, coluna 4 flocos de milho cozido, coluna 5 farinha de milho biju marca A, e coluna 6 farinha de milho biju marca B.

Fonte: Autoria Própria

Nota-se que em todas as amostras foi possível visualizar bandas de DNA, a banda apresentada na quarta coluna é considerada a mais pura, ou seja, são visualizadas poucas sujidades como proteínas e RNA na amostra, nessa coluna é possível observar a imagem da banda do DNA presente e uma pequena quantidade de sujidades. Entretanto a segunda, terceira, quinta e sexta coluna além de apresentarem bandas mais visíveis de DNA, elas são consideradas mais impuras, pois além de se observar as bandas de DNA também se notam a presença na coluna de um fragmento que na imagem aparece com a coloração branca, sendo assim além de visualizar o fragmento de DNA tem-se a visualização de um grande número de sujidades na amostra.

A pureza do DNA pode ser afetada por materiais como polissacarídeos, lipídeos e polifenóis. Durante a extração, a contaminação da amostra pode ocorrer também pelo CTAB utilizado¹⁰.

Também há amostras em quem não é possível observar a presença de bandas de DNA visíveis, o não aparecimento das bandas pode ocorrer pela dificuldade de extração de DNA de certos tipos de amostras como por exemplo amostras que passaram por diversas etapas de processamentos, pois o processamento das mesmas pode causar a degradação do DNA². A dificuldade de visualização de DNA, também pode ocorrer, devido ao fato de que amostras com grande teor de amido como é o caso das farinhas, gelificam durante o processo de extração do DNA já que em algumas etapas as amostras são submetidas a temperaturas acima de 60°C.

No estudo de Souza *et al* (2014)¹⁶, observa-se que a extração em amostras de amido de milho, obteve o menor rendimento, pois alimentos que são submetidos a altos níveis de processamento tem baixo rendimento na quantidade de DNA extraído. O amido de milho, por exemplo, apresentou o menor rendimento e qualidade em todos os protocolos testados. Já o milho em grão, por ser um alimento minimamente processado, alcançou um alto rendimento se comparado com as demais amostras.

Além da presença de DNA degradado outras situações também dificultam a detecção de OGMs, como a existência de diferentes cultivares GMs e deficiência de informação em relação à sequência inserida¹⁰.

A fase de amplificação do DNA em sistema de PCR convencional tem como objetivo identificar a presença do promotor 35S do DNA isolado. Esse gene indica a presença de transgenia em amostras de milho¹⁷. Teoricamente observa-se que a técnica de PCR é uma análise sensível e precisa, sendo capaz de detectar apenas transgenia na amostra com apenas 0,01% de presença na mesma¹⁸.

A amplificação de farinhas de milho em sistema de PCR convencional, com o primer 35S, está representada nas figuras 2 e 3. Essas amplificações foram feitas com os DNAs extraídos na figura 1. Na figura 2 nas colunas 1 e 2 tem-se a amplificação do DNA extraído de farinha de milho flocada, e nas 3 e 4 DNA de flocos de milho. Na quinta coluna tem-se o marcador de 100bp.

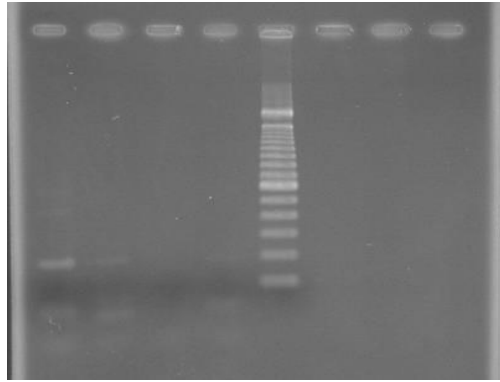


Figura 2 – Gel de agarose com o resultado da amplificação do promotor 35S a partir de amostras de farinhas de milho flocada e flocos de milho: coluna 1 farinha de milho flocada diluída 4x, coluna 2 farinha de milho flocada diluída 8x , coluna 3 flocos de milho não diluído, coluna 4 flocos de milho diluído 2x, coluna 5 marcador 100pb.

Fonte: Autoria Própria

As mostras das colunas 1, 2 e 4 da figura 2 – A foram diluídas 4, 8 e 2 vezes respectivamente, já a amostra 3 não foi diluída. Nota-se que as bandas encontradas nas colunas 1, 2 e 4 estão na linha de 200 pares de base do marcador, confirmando a transgenia das amostras.

Na figura 3 tem-se a amplificação de dez amostras, na qual cinco delas são DNA's de farinha de milho flocada e cinco de flocos de milho cozido respectivamente, porém, estas amostras não foram diluídas, em todas as colunas é possível observar que o DNA aparece na banda de 200 pb indicando a transgenia das amostras.

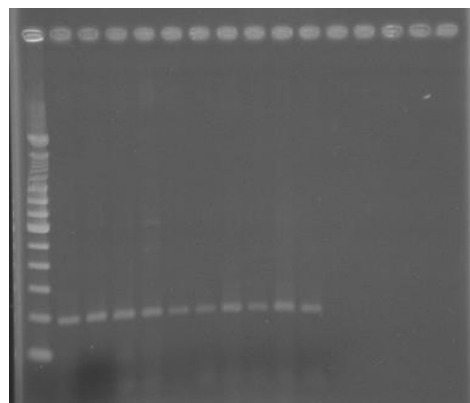


Figura 3 – Gel de agarose com o resultado da amplificação do promotor 35S a partir de amostras de farinhas de milho flocada e flocos de milho: coluna 1 marcador molecular 100pb, colunas 2, 3, 4, 5 e 6 farinha de milho flocada, colunas 7, 8, 9, 10 e 11 flocos de milho cozido

Fonte: Autoria Própria

Assim observa-se que a amplificação apresentou-se eficaz para amostras de farinhas de milho flocada. A eficácia da amplificação deve-se ao fato da farinha de milho ser um produto que não utiliza elevadas temperaturas ao ser processado, assim tem-se o DNA preservado.

3.1 VISUALIZAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO

Para a análise de produtos preparados utilizou-se duas amostras de mistura para bolo sendo uma mistura de bolo de chocolate, e uma de bolo de milho, cereal marca A, cereal marca B, e uma amostra de sêmola de milho. Como é possível observar na figura 4, somente foi possível visualizar banda de DNA na coluna 6 que contém a amostra de sêmola de milho.

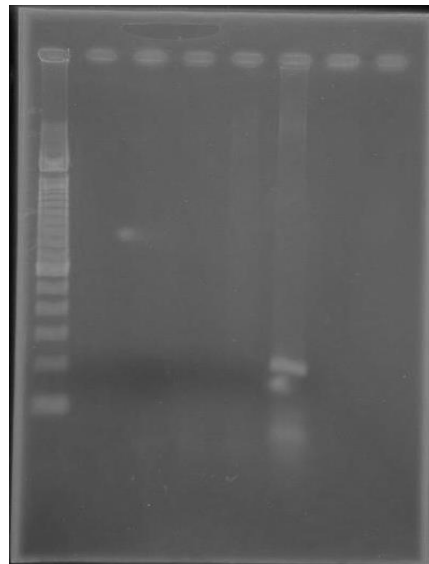


Figura 3 – Gel de agarose com o resultado da amplificação do promotor 35S a partir de amostras de preparados: coluna 1 marcador 100 pb, coluna 2 mistura para bolo de chocolate, coluna 3 mistura para bolo de milho, coluna 4 cereal marca A, coluna 5 cereal marca B e coluna 6 sêmola de milho.

Fonte: Autoria Própria

A não visualização de bandas de DNA nestas amostras pode ser ocasionada devida o fato de que produtos que passam por muitas etapas de processamento e são submetidos a tratamentos químicos ou físicos, atividades enzimáticas ou submetidos a estado de pH elevado, podem ter seu DNA fragmentado tornando-o inviável para a análise via PCR

convencional. A composição dos produtos a ser analisados também pode interferir nos resultados das análises como é o caso de amostras em que adiciona-se outros ingredientes como: proteínas, gorduras, polissacarídeos e sal⁹.

Segundo Ferrari (2005)¹⁰ em alimentos processados o DNA é altamente degradado, afetando assim a habilidade de detectar sequências específicas pela PCR. Durante o processo de produção a exposição ao calor, baixo pH e utilização de nucleases, são os principais fatores que interferem na degradação enzimática.

3.2 TESTE DE SENSIBILIDADE

Utilizou-se cinco amostras a quais foram preparadas no laboratório de Bioengenharia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Ponta Grossa, as amostras utilizadas continham 50grs. de uma mistura de farinha de milho transgênica com farinha de trigo, com as seguintes concentrações de farinha de milho transgênica: 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.

Apresenta-se na primeira coluna da Figura 4 o marcador de peso molecular, seguido por 5 colunas com amostras nas seguintes concentrações: 20%, 40%, 60%, 80% e 100%. Observa-se que a banda da segunda coluna mostra-se mais fraca, sendo a amostra com de menor concentração, de farinha transgênica.

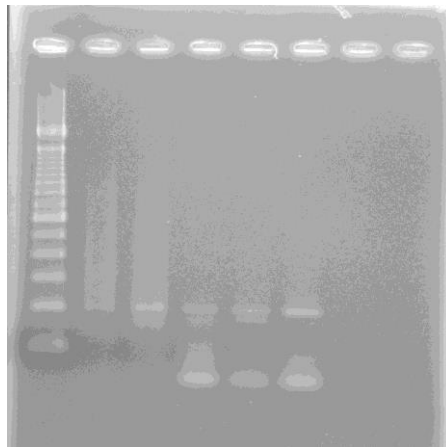


Figura 4 - Gel de agarose com o resultado da amplificação do promotor 35S a partir de amostras de diferentes concentrações de farinhas de milho transgênica: coluna 1 marcador 100 pb, coluna 2 amostra 20%, coluna 3 amostra 40%, coluna 4 amostra 60%, coluna 5 amostra 80%, coluna 6 amostra 100%.

Fonte: Autoria Própria

O teste de sensibilidade demonstrou que a PCR foi capaz de detectar a presença de transgênico nas cinco concentrações testadas.

Realizaram-se análises para obter resultados mais precisos em relação à especificidade da técnica da PCR, entretanto até o momento não foram obtidos resultados satisfatórios utilizando a técnica do PCR em amostras com concentrações abaixo de 20%.

Como alternativa para analisar as amostras com concentrações abaixo de 20%, tem-se a técnica da PCR em tempo real, que permite realizar o monitoramento da reação no decorrer de todas as etapas da amplificação utilizam-se moléculas fluorescentes, que medem a fluorescência emitida durante todos os ciclos da reação, a fluorescência atua como indicador das amplificações produzidas em cada fase¹⁹.

A técnica da PCR em Tempo Real é dividida em três fases sendo elas: fase lag: nesta fase não ocorre a liberação do corante para que seja possível realizar a detecção da fluorescência; fase exponencial: nesta fase já ocorre o aumento do sinal fluorescente, e a quantidade de produtos da amplificação dobra a cada ciclo, é nesta fase que ocorre a quantificação da PCR devido o grande número de produtos que foram amplificados, e a fase final da reação: já não se tem mais o aumento do número de produtos e amplificação, e todos os reagentes já foram consumidos, finalizando a reação¹¹.

Com a PCR em tempo real é possível quantificar o DNA transgênico presente na amostra, e obter resultados específicos e reprodutíveis, sendo que se tem a possibilidade de monitorar todas as etapas da reação de amplificação.

4 CONCLUSÃO

Com o trabalho realizado, conclui-se que com a técnica da PCR convencional é possível a avaliação de OGM's em alimentos, também foi possível observar que se tem a necessidade de adaptar a técnica constantemente, pois quando se tem farinhas em mesclas a visualização de OGM's apresenta dificuldades, pelo fato de que quanto maior o processamento do produto tem-se o aumento do grau de dificuldade, ao ponto da técnica não revelar a presença de transgenia.

Em relação à sensibilidade da técnica observou-se, que não foi possível a detecção de transgenia em amostras com percentual abaixo de 20% de produto transgênico. Com isso nota-se a necessidade de utilizar técnicas mais precisas como a PCR em tempo real, para

identificar transgenia em produtos com concentrações abaixo de 20% de OGM's, para que seja possível adequar a rotulagem do produto de acordo com a legislação vigente.

4 REFERÊNCIAS

- [1] CONTRI, Gazoto Daniela. Detecção de Resíduos de DNA em Alimentos: **Avaliação da qualidade, quantidade e da capacidade de amplificação por PCR de DNA extraído de matérias-primas e produtos acabados para fins de análise transgênica**. Dissertação (Mestrado) apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos Área Bromatologia da Universidade de São Paulo, 2006.
- [2] CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C.. **Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares**. Revista Ciência Rural, v.36, n.1, p. 315 - 324, Santa Maria, 2006. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n1/a53v36n1.pdf>> Acesso em 25 de fevereiro de 2014.
- [3] LEITE, D. S.; MUNHOZ, L. L.. **Biotecnologia e melhoramento das variedades de vegetais: cultivares e transgênicos**. Revista Veredas do Direito, v.10, n.19, p. 24-44, Belo Horizonte, 2013. Disponível em <<http://www.domhelder.edu.br/revista/index.php/veredas/article/view/301>> Acesso em 03 de março de 2014.
- [4] SECRETARIA DA FAZENDA. **Milho e seus derivados**. Governo do Estado, Pernambuco, 2013. Disponível em: <<https://www.sefaz.pe.gov.br/Legislacao/Tributaria/Consolidada-Por-Assunto/Paginas/Trigo-e-Derivados.aspx>> Acesso em 25 de julho de 2014.
- [5] MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. **Manejo integrado de pragas em lavouras plantadas com milho geneticamente modificado com gene bt (Milho Bt)**. Embrapa Milho e Sorgo, 2009. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/milhoBT.htm> Acesso em 01 de março de 2014.
- [6] BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE- ZANETTINI, M. H. **Genes de Bacillus thuringiensis: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas**. Revista Ciência Rural, Santa Maria, v.34, n.1, p. 843-850, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782003000500008> Acesso em 18 de outubro de 2014.
- [7] PARENTONI, S.N.; MIRANDA, R.A.de; GARCIA,J.C. **Implicações sobre a Introdução dos Transgênicos em Programas de Melhoramento de Milho no Brasil**. Revista Raça Cortar. Appl. Biotechnol Viçosa, MG,vol 13, n 1, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-70332013000100002&script=sci_arttext > Acesso em 21 de outubro de 2014.
- [8] BARROS, Natália Eudes Fagundes de; OLIVEIRA, Edna Maria Morais; MARIN, Victor Augustus. **Aplicabilidade da Metodologia de Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real na Determinação do Percentual de Organismos Geneticamente Modificados em Alimentos**. Revista de Nutrição, Campinas, v. 21, n. 1, p.85-92, 13 mar. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732008000100009&script=sci_arttext>. Acesso em 09 de setembro de 2014.

- [9] MARCELINO, Francismar Corrêa. **Avaliação de Resíduos de Transgênicos em Alimentos no Brasil e Desenvolvimento de Metodologias de Análises**. 2006. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. Disponível em: <http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp027430.pdf>. Acesso em 28 de setembro de 2014.
- [10] FERRARI, Cibele dos Santos. **Detecção de Soja Geneticamente Modificada em Alimentos por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Utilizando Diferentes Iniciadores Específicos e DNA Extraído com Três Protocolos**. 2005. 71f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/10/browse?value=Arisi%2C+Ana+Carolina+Maisonave&type=author>>. Acesso em 07 de outubro de 2014.
- [11] DINON, Andréia Zilio. **Detecção por Pcr de Milho Geneticamente Modificado (Mon810) em Farinha De Milho, Fubá, Biju e Polenta**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Departamento de Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/90672>>. Acesso em 19 de agosto de 2014.
- [12] MENEZES, S. M. de; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B; VILLELA, F. A. **Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas**. Revista Brasileira de Sementes, vol 26, nº 2, p. 150-155, 2004. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222004000200021>. Acesso em 30 de setembro de 2014.
- [13] EMBRAPA. **Milho**. 2011 Disponível em < <http://www.cnpms.embrapa.br/mipmilho/arquivos/500PRMT.pdf> >. Acesso em 19 de agosto de 2014.
- [14] MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. **Extração de DNA de Tecido Vegetal de Araucária Angustifolia (Araucariaceae)**. Bol. Pesq. Fl., Colombo, n. 41, p.12-17, jul./dez. 2000.
- [15] MIRANDA, R. R.; BOREIKO, S. **Otimização de Diagnóstico Molecular para Soja Geneticamente Modificada**. Tese (Conclusão de Curso) Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011.
- [16] SOUZA, A. G. de; ALVEZ, P. T.; VIERIA, C. U.; GOURLAT; V. A. **Comparação de métodos de extração de DNA e detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos processados derivados de milho**. Revista Saúde e Tecnologia, n.11, p. 17-22, 2014. Disponível em < http://www.estesl.ipl.pt/sites/default/files/ficheiros/pdf/artigo_3_saude_e_tecnologia_11.pdf>. Acesso em 27 de outubro de 2014.
- [17] MARCELINO, F. C.; MARTINS, M. F.; PIMENTA, M. A. C.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G.. **Detecção de resíduos transgênicos em grãos e produtos derivados**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, edição nº 31, julho- dezembro de 2003.

Disponível em <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio31/detec_trans.pdf>. Acesso em 25 de fevereiro de 2014.

[18] DUIJN, G.V.; BIERT, R.V.; MARCELIS, H.B.;PEPPELMAN,H.; HESSING, M. **Detection Methods for Genetically Modified Crops**. Food control n 10 p. 375- 378, 1999.

[19] RAMOS, D. M.N. **Desenvolvimento da PCR em Tempo Real para amplificação do gene da Enzima Málica (ME) em isolados de Giardia duodenalis**. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado)- Curso de Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, 2011. Disponível em: <<http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4172>>. Acesso em 15 de outubro de 2014.

[20] NOVAIS, S. M.; PIRES-ALVEZ, M.; **PCR em tempo real**. Revista Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento, n^a33, p. 10 – 13, 2004. Disponível em <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>> Acesso dia 10 de dezembro de 2014.