

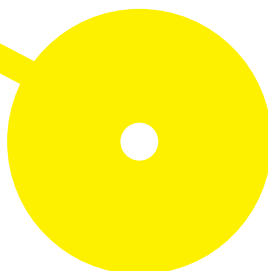
M

MESTRADO
ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

Implementação e Validação da técnica de PCR em tempo real na identificação de organismos geneticamente modificados em alimentos

Cláudia Soares Queirós

09/2023





Implementação e Validação da técnica de PCR em tempo real na identificação de Organismos Geneticamente Modificados em alimentos

Autor

Cláudia Soares Queirós

Orientador(es)

Professora Maria Manuela Amorim, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Professor António Augusto Araújo Gomes, Biogerm S.A., Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Professor Hugo Daniel Carvalho de Azevedo Rocha, INSA-Porto, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Área de Especialização em Microbiologia e Saúde Pública pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a todas as pessoas envolvidas durante o meu mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública, no ramo da Microbiologia e Saúde Pública na Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS/IPP).

Um especial agradecimento à Prof.^a Doutora Maria Manuela Amorim pelo tempo, dedicação e paciência durante toda a minha formação. Ao Prof. Doutor António Augusto Araújo por me ter aceitado a estagiar na Biogerm SA e pela ajuda disponibilizada durante o estágio.

Um muito obrigado ao Prof. Doutor Hugo Rocha, por toda a paciência sem limites, a dedicação e sobretudo pela ajuda na realização deste estágio. Obrigado pela boa disposição em todos os momentos na elaboração do relatório.

Obrigado a duas pessoas muito especiais que aqui já não se encontram, mas que foram e são muito importantes para mim. Por fim, quero agradecer à minha família, sobretudo aos meus pais e irmão, pelo carinho, paciência e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Resumo

A Engenharia Genética foi um dos maiores avanços tecnológicos, possibilitou a transferência de genes desejáveis entre organismos originando o aparecimento de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) e conseqüentemente o cultivo de plantas transgênicas.

Ao longo do tempo, o número de OGMs comercializados/cultivados tem aumentado e tem surgido várias preocupações relativamente à sua segurança. Ainda hoje, o uso de OGM é objeto de debate entre a comunidade geral. À vista disso, a UE criou um quadro legislativo referente à presença de OGM, obrigando à rotulagem e rastreabilidade de cada gênero alimentício, o que permite oferecer uma informação completa ao consumidor. Para garantir a conformidade com as normas aprovadas, recorre-se a metodologias adequadas para a detecção e quantificação de OGM. Os métodos baseados no ADN, especificamente o PCR em tempo real são os de eleição para a detecção e quantificação de OGM.

O estágio foi realizado num Laboratório de Saúde Pública, especificamente, num Laboratório de Biologia Molecular e teve como principais objetivos integrar conhecimentos e adquirir diversas competências na metodologia para a detecção de OGM. O objetivo do caso de estudo foi a implementação e validação da técnica de PCR em tempo real na identificação de OGMs em alimentos.

A detecção e quantificação dos marcadores P-35s e T-nos por PCR em tempo real em amostras de Soja e Milho em diferentes estados físicos foi efetuada. Trata-se de um método sensível, dado que foi possível detetar com um nível de confiança de 95% uma quantidade de ADN dos marcadores inferior a 15,2 pg/reação. Além disso, o marcador P-fmv foi detetado com um nível de confiança de 95 % uma quantidade de 5 cópias/reação.

O equilíbrio entre a segurança alimentar e a qualidade alimentar tem de estar presente em todos os passos da cadeia alimentar de forma a garantir a segurança do Homem, animal e do meio ambiente.

Palavras-chave: Organismos Geneticamente Modificados; OGMs; PCR em tempo Real; qPCR; P-35s; T-nos

Abstract

Genetic Engineering has been one of the greatest technological advances, enabling the transfer of desirable genes between organisms giving rise to the emergence of Genetically Modified Organisms and consequently the cultivation of transgenic plants.

Over time, the number of GMOs commercialized/cultivated has increased and several concerns have arisen regarding their safety. Even today, the use of GMOs is a matter of debate among the general community. In view of this, the EU has put in place a legislative framework regarding the presence of GMOs, obliging the labeling and traceability of each foodstuff, which allows to offer complete information to the consumer. To ensure compliance with the approved standards, appropriate methodologies are used for the detection and quantification of GMOs. DNA-based methods, specifically real-time PCR, are the methods of choice for GMO detection and quantification.

The internship was conducted in a Public Health Laboratory, specifically, in a Molecular Biology Laboratory and its main objectives were to integrate knowledge and acquire various skills in the methodology referred to for the detection of GMOs. The objective of the case study was the implementation and validation of the real-time PCR technique in the identification of GMOs in food.

The detection and quantification of P-35s and T-nos markers by real-time PCR in Soybean and Maize samples in different physical states was performed. It is a sensitive method since it was possible to detect with a confidence level of 95% an amount of DNA of the markers lower than 15,2 pg/reaction. In addition, the marker P-five was detected with a 95 % confidence level at an amount of 5 copies/reaction.

The balance between food safety and food quality must be present at every step of the food chain to ensure the safety of humans, animals and the environment.

Keywords: genetically modified organisms; GMOs; Real Time PCR; qPCR; P-35s; T-nos

Índice

Lista de Siglas e Abreviaturas.....	VIII
Índice de Tabelas.....	IX
Índice de Figuras.....	X
Capítulo I- Estágio.....	1
1.1. Instituição e Contextualização do estágio.....	1
1.2. Objetivos.....	1
1.3. Atividades Desenvolvidas.....	2
1.3.1. Extração de ADN	2
1.3.2. Quantificação da Concentração de ADN e Avaliação do Grau de pureza	2
1.3.3. PCR em Tempo Real.....	2
Capítulo II- Estudo de Caso	3
1. Introdução	3
1.1. Transformação Genética nas plantas.....	4
1.2. Produção e Mercado de OGM	5
1.3. Riscos e Benefícios	6
1.4. Legislação	8
1.5. Métodos de deteção	10
1.5.1. Métodos de deteção baseado em ADN.....	11
1.5.1.1. PCR Qualitativo.....	12
1.5.1.2. PCR em tempo real.....	13
1.5.2. Métodos de deteção baseado na análise de proteínas	15
1.5.2.1. ELISA.....	15
1.5.2.2. Dispositivos com tiras de fluxo lateral	15
1.6. Alvos a analisar.....	16

2.	Objetivos.....	17
3.	Material e Métodos.....	17
3.1.	Materiais de Referência Certificados.....	17
3.2.	Amostras de Controlo de Qualidade Externo (CQE).....	17
3.3.	Extração de ADN	18
3.4.	Medição da Concentração de ADN e avaliação do Grau de Pureza.....	19
3.5.	PCR em Tempo Real.....	19
3.6.	Limite de Detecção e de Quantificação.....	20
4.	Resultados.....	22
4.1.	Implementação da técnica.....	22
4.2.	Validação do Método.....	24
5.	Discussão.....	33
6.	Conclusão.....	36
	Referências Bibliográficas.....	37
	Anexo A- Representação das curvas de calibração referenciadas no texto como figuras 7,8,9.41	

Lista de Siglas e Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

OGM – Organismo Geneticamente Modificado

GM – Geneticamente Modificado

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

UE – União Europeia

ISAAA – *The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*

DGAV – Direção Geral da Alimentação e Veterinária

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

AESA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

THG – Transferência Horizontal de Genes

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RSDr – *Relative Standard Deviation*

pb – Pares de Base

FRET – *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

Ct – *Cycle Threshold*

ELISA – *Enzyme-Linked immunosorbent assay*

LFT – Dispositivos com tiras de fluxo lateral

MRC – Material de Referência Certificado

CQ – Controlo de Qualidade Externo

µl – Microlitro

ml – Mililitro

xg – Força G (Força Gravitacional)

ng – Nanograma

LOD – *Limit of Detetion*

LOQ – *Limit of Quantification*

TE – Tris EDTA

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

TALENs – transcription activator-like effector nucleases

CRISPR/CAS – clustered regularly interspaced short plaindromic repeats – CRISPR associated proteins

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Sequências de Primers e Sondas utilizadas, bem como os volumes pipetados para cada poço.....	20
Tabela 2 – Concentração de ADN e grau de pureza dos MRCs BT11 e GTS.....	22
Tabela 3 – Ensaios de PCR em tempo real: declive, eficiência ¹ e R ² de cada marcador.....	24
Tabela 4 – Valores de Ct para as diluições do MRC GTS 40–3–2	25
Tabela 5 – Valores de Ct para a % de 0,005.....	25
Tabela 6 – Valores da média, desvio padrão e do desvio padrão relativo (RSDr) para os dois marcadores.....	26
Tabela 7 – Valores de Ct para as diluições do MRC GT73.....	26
Tabela 8 – Repetibilidade do método de PCR na concentração de 5 cópias/reação do GT73....	27
Tabela 9 – Concentração de ADN e grau de pureza das amostras Farinha	27
Tabela 10 – Valores de Ct dos marcadores P–35s e T–nos.....	27
Tabela 11 – Valores de Ct para os marcadores P–35s, T–nos e 18S na Farinha de Soja e Farinha de Milho	28
Tabela 12 – Equações da reta de cada marcador; Valores de Ct para cada marcador e a sua concentração final em %.....	29
Tabela 13 –Concentração de ADN e grau de pureza das amostras Farinha de Milho e Soja em Grão.....	30
Tabela 14 – Valores de Ct de P–35s e T–nos	30
Tabela 15 – Valores de Ct para os marcadores P–35s e 18S na matriz Farinha de Milho.....	31
Tabela 16 – Equações da reta de cada marcador; Valores de Ct para cada marcador e a sua concentração final em %.....	31
Tabela 17 – Valores da concentração experimental de cada marcador; concentração de cada marcador do CQE.....	32

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema do fluxo de trabalho na deteção de OGM (Original de (24)).....	11
Figura 2 – Curva de amplificação obtida com as amostras OGMs Farinha de Milho e Farinha de Soja e o respetivo controlo negativo.....	23
Figura 3 – Curva de amplificação específica para o marcador P-fmv detetada no evento GT73 e o respetivo controlo negativo.....	23
Figura 4 – Curvas de calibração para os marcadores P-35s, T-nos e P-fmv	24
Figura 5 – Curva de calibração para o marcador P-35s em função do logaritmo da quantidade de ADN nas amostras Farinha de Soja e Farinha de Milho.....	28
Figura 6 – Curva de calibração para o marcador T-nos em função do logaritmo da quantidade de ADN nas amostras Farinha de Soja.....	29
Figura 7 – Curva de calibração para o gene 18S em função do logaritmo da quantidade de ADN nas amostras Farinha de Soja e Farinha de Milho.....	42
Figura 8 – Curva de calibração para o marcador P-35s em função do logaritmo da quantidade de ADN na amostra Farinha de Milho.....	42
Figura 9 – Curva de calibração para o marcador 18S em função do logaritmo da quantidade de ADN na amostra Farinha de Milho.....	43

Capítulo I– Estágio

O presente trabalho surge no âmbito da Unidade Curricular Estágio do Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública, na área de especialização da Microbiologia e Saúde Pública, na Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS/P.Porto). Neste capítulo é feita uma contextualização do estágio e a respetiva instituição onde foi realizada.

1.1. Instituição e Contextualização do estágio

O estágio foi realizado na empresa Biogerm– Laboratórios S.A., especificamente no laboratório de Biologia Molecular, de 11 de outubro a 30 de junho, sob a orientação do Prof. António Araújo e Prof. Hugo Rocha. O presente relatório tem como foco descrever todas as atividades realizadas durante o estágio laboratorial. O ponto central deste estágio é a implementação e validação da metodologia de PCR em tempo Real para a identificação de Organismos Geneticamente Modificados em alimentos.

A Biogerm SA, é uma empresa constituída em 1994, sediada no conselho da Maia. É um laboratório de referência na área da Saúde Pública, onde são realizadas análises microbiológicas e químicas no controlo da qualidade alimentar, água e ambiente. A Biogerm SA. possui vários laboratórios, os de Preparação de Meios de Cultura, de Microbiologia que está dividida em água e alimentos, de Biologia Molecular e Sala de Confirmações.

1.2. Objetivos

Este estágio curricular permitiu compreender o funcionamento de um laboratório acreditado no âmbito da Biologia Molecular. Sendo assim, teve como objetivos:

- Adquirir e aprofundar conhecimentos e práticas em diversas metodologias realizadas durante o estágio, em específico na área da Biologia Molecular;
- Desenvolver capacidade de trabalho autónomo num laboratório de Biologia Molecular, bem como as competências interpessoais ao integrar numa equipa de trabalho;
- Realizar metodologias de deteção com base na PCR em tempo real.

1.3. Atividades Desenvolvidas

Neste relatório irei descrever todas as atividades observadas ou realizadas durante o estágio. Serão ainda relatados, os conhecimentos e as competências adquiridas em todas etapas do processo da análise da amostra.

1.3.1. Extração de ADN

A extração de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) das amostras utilizadas no decorrer deste estágio foi o primeiro passo realizado. Para a extração de ADN, recorreu-se ao kit *DNeasy® mericon® Food Handbook*, da marca QIAGEN que está descrito no Capítulo II no ponto 3.3 do presente trabalho.

1.3.2. Quantificação da Concentração de ADN e Avaliação do Grau de pureza

Para cada amostra é quantificado o ADN extraído e avaliado o grau de pureza com recurso ao *NanoDrop One*. A concentração é determinada com base na absorvância a 260 nm e é expressa em ng/ μ l e o grau de pureza avaliado com base na razão Abs260/Abs280.

1.3.3. PCR em Tempo Real

As reações de amplificação para a deteção e quantificação dos marcadores P-35s, T-nos e P-fmv são realizadas com recurso a sondas TaqMan® (*Applied Biosystems*), utilizando a técnica de PCR em Tempo Real.

Para a reação, foram utilizadas sondas e primers específicos para cada marcador. Além disso, foi usado como controlo interno o gene 18S que permite avaliar a eficiência da reação de PCR em Tempo Real.

As condições de tempo e temperatura da reação de amplificação foram de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95 °C durante 15 minutos; 45 ciclos que contemplam um ciclo de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos e um ciclo a 60 °C durante 1 minuto para promover o emparelhamento dos primers e extensão. A amplificação foi efetuada num termociclador QuantStudio™5-96-well0,1-mlBlock Applied Biosystems da Thermo Fisher e analisada com recurso ao software QuantStudio™Design e Analysis V1.5.1.

Capítulo II- Estudo de Caso

Neste capítulo é desenvolvido e contextualizado o estudo de caso “ Implementação e Validação da Técnica de PCR em Tempo Real na identificação de Organismos Geneticamente Modificados em Alimentos”

1. Introdução

Desde sempre que o Homem tem a necessidade de aumentar a produção e aprimorar a qualidade dos alimentos. No século XX, com o avanço da ciência surgiu a engenharia genética, com o desenvolvimento de um conjunto de ferramentas e de métodos que permite a modificação de sequências de ADN de um organismo (1).

A partir da década de 80 ocorreu o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de ADN recombinante que impulsionou um grande avanço biotecnológico e conduziu ao aparecimento de OGMs. De acordo com a Diretiva 2001/18/CE, OGM é o organismo, à exceção do Homem, que teve o seu material genético modificado através do uso de técnicas de DNA recombinante e não a partir de uma forma espontânea/ natural (2). Em 1994, foi aprovado o primeiro género alimentício geneticamente modificado para consumo humano. O tomate denominado de Flavr Savr, foi alterado geneticamente para apresentar uma maior durabilidade em relação aos tradicionais (3).

O avanço da engenharia genética permitiu o aparecimento de novas variedades de espécies vegetais, sobretudo com características benéficas, tais como a resistência a herbicidas, a insetos e a situações adversas. A introdução de culturas geneticamente modificadas (GM) trouxe inúmeras vantagens desde a redução da contaminação do solo, redução do uso de pesticidas e aumento do rendimento de produção das culturas agrícolas(4).

A questão do uso ou não de OGM é objeto de debate mundial na comunidade. Se por um lado as vantagens/benefícios do uso de OGMs eram observadas como um impacto positivo, por outro lado, diferentes grupos desde biólogos, epidemiologistas até mesmo políticos afirmavam não existirem estudos suficientes que demonstrem que o uso/ comercialização de OGMs é seguro para o Homem, animais e ambiente (5). A temática dos OGMs é bastante controversa porque embora os benefícios desta nova biotecnologia agrícola estejam bem definidos e sejam inegáveis ,parte da comunidade científica questiona os custos e riscos associados ao uso desta biotecnologia. Questões e preocupações públicas em relação à segurança alimentar e ambiental estão presentes na tomada de decisão do uso ou não de OGMs.

Em consequência do aumento do número de organismos geneticamente modificados e da preocupação da comunidade, foi necessário criar uma legislação relativa ao domínio dos OGMS. A relação risco/benefício do uso de produtos GM tem de estar clara e objetiva para que os consumidores possam fazer uma escolha consciente. A legislação na UE é constituída por várias diretivas e regulamentos que tem como foco principal a segurança do Homem, dos animais e do ambiente. A legislação obriga a rotulagem dos produtos GM de forma a garantir uma escolha informada e consciente por parte do consumidor. Obriga ainda à rastreabilidade de qualquer produto GM para permitir uma resposta rápida em caso de adversidade. O quadro legislativo na EU proporciona uma harmonização regulamentar que garante a troca de informações sobre os riscos/benefícios e promove a compreensão entre países, bem como um aumento da eficiência do processo de avaliação da relação riscos/segurança (6).

A Biogerm é uma empresa em constante crescimento que fornece apoio aos clientes nas mais variadas vertentes no que diz respeito às análises microbiológicas e químicas em água, alimentos e ambiente. Trata-se de um laboratório de referência, onde a chave do sucesso passa por possuir as metodologias mais recentes e permitir uma resposta rápida e fiável ao consumidor. O uso de géneros alimentícios derivados de OGMS é um tema atual na sociedade, sendo assim, é importante a implementação de um sistema de deteção de OGMS em laboratório. Neste contexto, este estágio laboratorial tem como principais objetivos implementar e validar a técnica de PCR em tempo real na identificação de OGMS em alimentos.

1.1. Transformação Genética nas plantas

A transformação genética das plantas é retratada como um avanço tecnológico na ciência moderna que, não só permitiu consolidar conhecimentos sobre a biologia das plantas como também é o ponto-chave para o aperfeiçoamento genético das culturas agrícolas. A transformação genética consiste na transferência de um gene de interesse para o genoma de uma planta hospedeira (7).

Na modificação genética da planta, os métodos de transferência de genes podem ser agrupados em: transferência de genes mediada por vetores e transferência direta (7).

A primeira técnica a ser desenvolvida, nos anos 80, utilizava a *Agrobacterium tumefaciens* para a transferência do gene de interesse. Trata-se de uma bactéria gram negativa fitopatogénica com capacidade de infetar e modificar as células vegetais onde está integrada (7). Esta bactéria

é constituída por um plasmídeo, denominado de Ti, responsável pela indução de tumores. Quando *A. tumefaciens* infeta uma célula, há a transferência de um segmento de T-ADN, uma porção do Ti, que é inserido de forma estável no genoma da planta hospedeira e depois transcrito (8). O plasmídeo ainda contém uma região denominada de vir (virulência) que não é transferida para a célula hospedeira, mas é essencial na integração do segmento de ADN no genoma da planta hospedeira (7). Embora a transformação mediada pela *A. tumefaciens* seja a mais utilizada, esta infeta apenas plantas dicotiledóneas (8).

Outra técnica muito utilizada é o bombardeamento de partículas, um método físico que pertence ao grupo onde há a transferência direta de genes. Neste método as moléculas de ADN são revestidas com partículas de metal (ouro ou tungsténio) e são aceleradas com objetivo de serem introduzidas no citoplasma da célula alvo. Após a entrada na célula, há a dissociação do complexo ADN-partículas e ocorre a integração do ADN no genoma da planta alvo (7).

Os avanços na tecnologia da engenharia genética permitiram o aparecimento de novas técnicas. É utilizado a terminologia edição genética que engloba as técnicas TALENs (transcription activator-like effector nucleases) e CRISPR/CAS (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR associated proteins) (9), sendo a última a mais utilizada. Em oposição às tecnologias de primeira geração, a edição genética permite alterações genéticas sem a introdução de ADN exógeno nas células (9). A técnica CRISPR/Cas9 permite a interação entre a endonuclease Cas9 e o RNA guia (gRNA). Este foi concebido para uma região genómica específica do alvo a ser alterado. A interação entre estes dois permite o reconhecimento da sequência alvo e a indução de quebras da cadeia dupla de ADN do alvo (10). O uso do sistema CRISPR/CAS9 sobrepôs-se à técnica TALEN, devido à sua facilidade de utilização e por ser mais acessível (11). Por outro lado, durante a codificação da proteína podem ocorrer efeitos fora do alvo e levar a mutações onde ocorre a perda de função ou alterações das proteínas (10).

1.2. Produção e Mercado de OGM

De acordo com “International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications” (ISAAA), verificou-se um aumento da área global plantada com culturas GM desde 1996 até ao ano de 2019. Em 2019, no 24^o ano de comercialização de Culturas GM, houve um decréscimo da área de plantação mundialmente para um valor de 190,4 milhões de hectares. Apesar de um leve declínio de adoção de culturas GM, em 5 países a produção de culturas GM aumentou, nos EUA a área

cultivada foi de 71,5 milhões de hectares, em segundo o Brasil com 52,8 milhões de hectares, a Argentina com uma área de valor igual a 24 milhões de hectares, o Canadá com um valor de 12,5 milhões de hectares e por fim, a Índia com 11,9 milhões de hectares cultivados (12).

Em 2019, as culturas GM ofereceram uma gama de produtos mais diversificada aos consumidores. Para além do milho, soja, algodão e canola foram incluídas culturas GM como a beterraba, a cana-de-açúcar, a beringela entre outras (12). Contudo, a soja tolerante ao herbicida glifosato, mais conhecida como Roundup Ready™ (RR) é uma das culturas vegetais GM mais importantes. No ano de 2019, a Soja foi cultivada numa área de 91,9 milhões de hectares que corresponde a cerca de 48 % da área total cultivada por culturas GM (12). Um total de 71 países adotaram as culturas vegetais GM mas apenas 29 destes cultivaram enquanto que 42 países apenas importaram os produtos.

Em Portugal, o cultivo de variedades GM é regulado pelo Decreto-Lei n.º 160/2005 de 21 de setembro, o qual fornece um conjunto de obrigações para cada um dos intervenientes na cadeia produtiva do produto, assim como determinadas normas e técnicas relativas ao cultivo das culturas vegetais GM (13). Este decreto tem como objetivo assegurar a coexistência das culturas convencionais com as culturas GM. As autoridades competentes nacionais responsáveis para certificar o cumprimento da regulamentação são a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) e a Agência Portuguesa do Ambiente (APA).

De acordo com a Legislação Portuguesa a respeito do tema OGM, o milho MON810 é o único OGM autorizado para cultivo em Portugal, mas que inclui várias variedades. Segundo o relatório de Acompanhamento de 2022 da DGAV, em 2022, uma área de valor igual a 2.287,36 hectares correspondia apenas a cultivo de milho geneticamente modificado (14). Embora, em Portugal, o milho MON810 seja o único OGM permitido para cultivo, há uma vasta gama de alimentos processados derivados de diferentes OGMs comercializados em Portugal. Atualmente, os OGMs autorizados para alimentação humana pela Autoridade Europeia para a segurança Alimentar (AES) pertencem a algumas espécies como, milho, colza, algodão, beterraba e soja.

1.3. Riscos e Benefícios

Desde sempre que o Homem tem vindo a alterar as culturas vegetais através da escolha das plantas com as características mais vantajosas com o objetivo de obter culturas vegetais com um crescimento rápido e obter um maior rendimento. Os possíveis riscos e benefícios associados à

modificação genética abrangem questões relacionadas à segurança alimentar e o impacto desta no ambiente. Tolerância a herbicidas e a resistência a insetos são as duas características mais comuns em culturas vegetais GM (4).

As culturas vegetais tolerantes a herbicidas trouxeram inúmeros benefícios para as explorações agrícolas. Foram desenvolvidas com o objetivo claro de resistir aos herbicidas específicos glifosato e glufosinato. Deste modo, os agricultores substituíram estes por herbicidas mais seguros para a sua manipulação e menos agressivos para o ambiente, o que permitiu uma diminuição da contaminação do solo, água e ar (4,15). A introdução de culturas vegetais com resistência a insetos permitiu por seu lado a diminuição do uso de inseticidas, o aumento do rendimento da produção agrícola e consequentemente uma alimentação a um preço mais acessível (16). A cultura GM tem contribuído com uma série de benefícios para a produção vegetal, mas também há produtos que oferecem benefícios diretos ao consumidor. O mais conhecido é o arroz dourado, criado em 2000, que é uma fonte suplementar de pró-vitamina A extremamente importante para o crescimento e reforço do sistema imunitário. Além disso, em países onde a deficiência de vitamina A é ainda um problema, o arroz dourado surge como uma solução para combater a carência desta vitamina (17).

Nem tudo relacionado ao uso de OGM são vantagens, havendo alguns estudos que levantaram questões sobre os potenciais riscos para a saúde do Homem e para o meio ambiente. A alergenicidade e toxicidade são dois dos riscos que podem afetar diretamente o Homem. As culturas GM implicam a introdução de novas proteínas nos géneros alimentícios, podendo estas desencadear reações alérgicas. A nível ambiental, a transferência horizontal de genes (THG) é um dos potenciais riscos. Podendo ocorrer a transferência de material genético de um organismo para outro (4). Quando relacionado ao uso de OGM, este processo traz inúmeros riscos que afetam diretamente o meio ambiente, desde diminuição da diversidade genética à biodiversidade (18).

É importante lembrar que para o cultivo/comercialização de uma cultura GM há um processo de avaliação da sua segurança para o Homem, animal e meio ambiente. Os benefícios e os riscos percebidos do uso de OGM, tem vindo a resultar em debates na comunidade científica, o que incentiva a existir regulamentação em todo o processo e no desenvolvimento de uma legislação que permita a proteção do Homem, do animal e do meio ambiente

1.4. Legislação

Desde o início dos anos 90 que o número de organismos geneticamente modificados tem aumentado e tem sido acompanhada pela preocupação da comunidade em geral e da científica em particular em relação ao uso de OGMs. A produção e a comercialização global de produtos derivados de OGMs podem acarretar riscos associados à saúde humana e ambiental, diante disso, torna-se necessário a implementação de um conjunto de procedimentos rigorosos que compõem a legislação sobre os OGMs. O quadro legislativo na União Europeia sobre os OGMs é altamente completo e exigente no que diz respeito à avaliação de riscos. A legislação tem como principais objetivos específicos a segurança humana, animal e ambiental e garantir que o mercado na UE funcione corretamente (19) O quadro regulamentar baseia-se em 3 pontos principais: avaliação dos riscos antes da colocação no mercado, a rastreabilidade e a rotulagem (19).

É do conhecimento geral que qualquer organismo colocado no meio ambiente tem a capacidade de se reproduzir e expandir para outros locais. Dessa forma foi fundamental a criação de instrumentos jurídicos que visam toda a problemática em torno dos OGMs. Na União Europeia, a diretiva 2001/18/CE relativa à libertação deliberada de organismos geneticamente modificados no ambiente, define procedimentos e critérios cruciais para a avaliação, caso a caso, de potenciais riscos para o ambiente e saúde humana e animal que resultem da produção de OGMs. Para a monitorização dos riscos para a saúde humana e ambiental, a Diretiva obriga à criação de um plano vigilância com o objetivo de detetar e identificar os riscos associados a produtos derivados de OGMs após terem sido colocados no mercado. Os Estados-Membros tem de verificar, de acordo com o Princípio da Precaução, que todas as medidas foram as adequadas para resguardar a saúde humana e ambiental (2).

O Regulamento (CE) nº 1829/2003 introduz princípios e regras para os géneros alimentícios que sejam colocados à disposição no mercado. Para garantir um elevado grau de proteção da saúde humana e animal e do meio ambiente, qualquer género alimentício geneticamente modificado que seja colocado no mercado, previamente tem de ser submetido a uma série de avaliações com a finalidade de verificar que não existe nenhum risco associado a este. Assim, este regulamento para atingir o seu fim refere relativamente a estes géneros alimentício que: não devem originar efeitos nocivos para a saúde humana, animal e para o ambiente não devem induzir em erro o

consumidor; não diferir dos géneros alimentícios a que estejam destinados a substituir e que possam apresentar uma desvantagem a nível nutricional (20) Além disso, o Regulamento (CE) n.º 1829/2003 incorpora um limite mínimo de rotulagem para os géneros alimentícios, sendo que quando este apresenta um conteúdo geneticamente modificado autorizado superior a 0,9 % do total dos ingredientes que o compõe é obrigatório a sua rotulagem (20). Caso o conteúdo GM for abaixo deste limiar, a presença é considerada acidental ou inevitável. No entanto, o operador tem de estar habilitado para fornecer provas às autoridades competentes que confirmem que todas as medidas tomadas estão em conformidade com a legislação.

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) criada pelo Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho a 28 de janeiro de 2002 é fundamental para a avaliação do risco ambiental e da segurança dos alimentos. A AESA tem como tarefa, no domínio dos OGM, avaliar os potenciais riscos associados à utilização de OGM e dos géneros alimentícios derivados destes. Para além disso, a decisão de aprovar para a comercialização um OGM é tomada pela AESA e só depois de uma série de avaliações terem sido efetuadas (21). Para a avaliação dos riscos dos OGM, a AESA identifica e caracteriza os perigos com base nos seguintes princípios: i) caracterização molecular (análise da estrutura molecular, proteínas); ii) análise comparativa (deteção de diferenças na planta, características fenotípicas); iii) avaliação da potencial toxicidade e alergenicidade e iv) avaliação do potencial impacto ambiental (21).

A segurança na indústria alimentar é um dos principais focos da legislação e a fórmula ideal para preservar a segurança alimentar e garantir que os padrões da fase de produção estão em conformidade é adotar a rastreabilidade. No Regulamento (CE) n.º 1830/2003, a rastreabilidade é definida como a capacidade de rastrear os OGMs e os produtos derivados destes em todas as etapas de processo, desde a sua produção até à sua comercialização (22). Perante um problema, a rastreabilidade permite a localização da origem deste de forma rápida e eficaz e garante uma resposta orientada na resolução do problema. O Regulamento (CE) n.º 1830/2003 obriga à partilha de informações do produto que contém ou é constituído por OGM e do identificador único para cada OGM.

1.5. Métodos de detecção

Com o aumento de culturas GM, a monitorização destas é o ponto chave para garantir o cumprimento do regulamento associado à produção alimentar e garantir a segurança. Na UE, qualquer género alimentício que contenha um conteúdo GM autorizado superior a 0,9% dos ingredientes totais é obrigatório a sua rotulagem. Por conseguinte, o desenvolvimento de métodos de detecção e quantificação de OGM tornou-se cada vez mais relevante e desafiante.

As técnicas de detecção e quantificação de OGM são baseadas na observação das diferenças entre a planta tradicional e planta GM. Atualmente, há dois tipos de abordagens a seguir, os que visam o material genético modificado (ADN) e os que visam o produto resultante da modificação genética (proteína). As técnicas mais comuns baseadas na análise de proteínas incluem os imunoenaios, a espectrometria de massa e cromatografia. Ao contrário do que acontece na abordagem baseada nas proteínas, o ADN é extremamente resistente a elevadas temperaturas e por estar presente na maioria dos tecidos biológicos torna esta macromolécula a eleita para a detecção de OGM (23). O método baseado na detecção de ADN consiste na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), no qual é oferecido uma maior especificidade.

Atualmente, na UE, os laboratórios de referência no controlo de OGMs utilizam a técnica de PCR em tempo real na detecção de OGM (8). Atualmente, o fluxo de trabalho inicia-se pelo rastreio de sequências de elementos (ex: -35s e T-nos) que são encontradas em produtos derivados de OGM autorizados ou não autorizados. De forma a melhorar o sistema de detecção de OGM, surgiu um novo fluxo de trabalho que utiliza a tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), permitindo obter informações para demonstrar a presença de OGM não autorizado (24). Na Figura 1 está apresentado um esquema aprimorado do fluxo de trabalho na detecção de OGM.

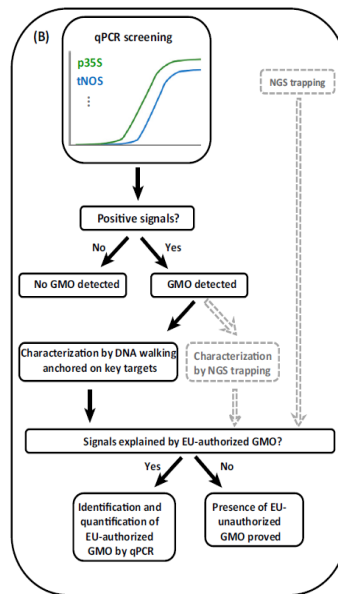


Figura 1– Esquema do fluxo de trabalho na deteção de OGM (Original de (24))

1.5.1. Métodos de deteção baseado em ADN

Os métodos de deteção de OGMs são maioritariamente baseados no ADN. Na UE, o PCR foi o primeiro método de rastreio validado para a deteção de OGM que eram comercializados (8).

A técnica de PCR permite a amplificação rápida e seletiva de segmentos específicos de ADN marcados dos eventos de modificação genética, para além de apresentar uma maior versatilidade (25). É considerada uma alternativa fiável aos métodos imunológicos, contudo se os segmentos de ADN alvo forem superiores a 300 pb (pares de base) a probabilidade de degradação destes aumenta no que resulta em falsos negativos quando se analisa amostras processadas (26), visto que o processamento dos alimentos provoca a fragmentação de ADN e consequentemente compromete a integridade do ADN. Para a análise por PCR são quatro os passos necessários, a recolha da amostra, a extração e purificação de ADN, amplificação dos ácidos nucleicos e a deteção dos produtos de amplificação.

Extração de ADN

Após a recolha da amostras, a extração e a purificação dos ácidos nucleicos são os primeiros passos para a deteção e quantificação de OGM. A extração de ADN é um factor extremamente importante, visto que é deste procedimento que se obtém os extratos de ADN para posterior amplificação por PCR.

Durante o processamento dos alimentos, o ADN é afetado por vários fatores como a temperatura, água e as variações do pH. Assim como a reação de PCR pode ser inibida por contaminantes da matriz alimentar e por solventes orgânicos (etanol, clorofórmio) provenientes do método de extração. Deve ser então escolhido um método de extração de ADN adequado que garanta uma remoção total de inibidores de reação que estejam presentes na amostra.

A extração de ácidos nucleicos requer a lise celular, a inativação das nucleases, a desnaturação das proteínas e a precipitação de ADN (8). De momento, existe uma diversidade de kits de extração e purificação disponíveis no mercado que permitem uma extração eficiente de ADN.

Porém, na escolha do método mais adequado é fundamental levar em consideração alguns critérios, tais como: o ADN alvo, a matriz em análise e a necessidade das técnicas subsequentes (27).

1.5.1.1. PCR Qualitativo

A Reação em cadeia da polimerase é uma técnica frequentemente usada para aferir a presença de material GM, usando oligonucleótidos específicos (primers) para amplificação da sequência alvo. É uma técnica que permite a amplificação rápida de milhares de cópias do ADN alvo em poucas horas e que oferece resultados com alta sensibilidade e especificidade. A amplificação por PCR baseia-se no processo de replicação de ADN e é com a ajuda de uma ADN polimerase, geralmente a *Taq* ADN polimerase isolada da bactéria *Thermus aquaticus*. A DNA polimerase sintetiza apenas de 5' para 3'. A replicação tem início na extremidade 3' do primer, onde há a incorporação dos dNTPs presentes na solução, permitindo a extensão e formação de uma cadeia dupla. Numa primeira fase, desnaturação, ocorre a separação da cadeia dupla de ADN em duas cadeias simples através do aumento da temperatura, geralmente a 95 °C. Na fase seguinte, há a diminuição da temperatura, entre 55 °C a 65 °C e os primers ligam-se às cadeias complementares. Por fim, a temperatura volta a aumentar, por volta dos 72 °C, visto que é a temperatura ideal para a atuação da *Taq* polimerase e ocorre a extensão dos primers, estes três passos são repetidos entre 30 a 40 vezes. O produto final da reação de PCR é detetado pelo aumento de fluorescência. No final, o número de cópias da sequência alvo é expressa em 2ⁿ. É uma técnica que permite a detecção de material GM mas não a sua quantificação, uma vez que a quantidade de produto gerado é medido após a fase exponencial, na fase plateau, sendo que nesta fase não é possível obter informação que permita avaliar a quantidade de amostra inicial.

Dado que a quantificação é um parâmetro relevante no que toca ao tema OGM, como solução para ultrapassar este problema surgiu o método PCR em tempo real.

1.5.1.2. PCR em tempo real

Na análise de alimentos, no caso do OGM, a legislação obriga a rotulagem de produtos comercializados onde o conteúdo GM é superior a 0,9% . Sendo assim, após a deteção da presença de um OGM é exigida a quantificação deste.

O PCR em tempo real permite a deteção e quantificação fiável dos produtos gerados em cada ciclo do PCR (28). O sinal de fluorescência, proporcional à quantidade de produto de PCR gerado em cada ciclo é visualizado num ecrã de um computador que está acoplado a um software que permite converter o sinal fluorescente numa estimativa quantitativa. O sistema do PCR em tempo real, faz uso de um termociclador com a capacidade de detetar a fluorescência. No final da reação de PCR, com recurso a um computador, obtém-se um gráfico da emissão de fluorescência em função do número de ciclos. As vantagens do uso desta técnica são a diminuição do risco de contaminação cruzada e a rapidez no fornecimento de resultados (29). Esta monitorização é possível devido ao uso de marcadores fluorescentes que se ligam a ADN de cadeia dupla ou sondas específicas marcadas com um fluoróforo (30).

A forma mais simples e económica na execução da técnica de PCR em tempo real é o uso de um corante universal SYBR Green. Trata-se de um agente intercalante, que emite um sinal de fluorescência quando se liga a ADN de cadeia dupla. Apesar de ser uma técnica barata e simples, a principal limitação é a sua especificidade que é mais reduzida. O corante SYBR Green liga-se a moléculas de ADN de cadeia dupla e durante a reação pode haver amplificação de produtos de PCR inespecíficos ou dímeros de primers que originam emissão de sinal, levando à diminuição da especificidade (28).

Para aumentar a especificidade da reação, foram desenvolvidas sondas de hidrólise, nomeadamente à do tipo Taqman. Trata-se de uma sonda com um corante denominado repórter na extremidade 5' e de um corante chamado de quencher na extremidade 3'. Esta sonda funciona com base no princípio da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET). Ou seja, caso a sonda estiver intacta, a fluorescência emitida pelo repórter é absorvida pelo quencher. Porém, durante o PCR, a sonda irá hibridizar com a sequência alvo na região específica entre os primers e quando esta é clivada pela atividade de nucleasse 5' da Taq polimerase ocorre a emissão de fluorescência durante a fase de extensão (8,28).

À medida que o PCR em tempo real decorre, os dados recolhidos são utilizados para a construção do gráfico da emissão de fluorescência em função do número de ciclos. Através da leitura do gráfico, é possível distinguir 3 fases. Uma primeira fase, denominada de linear ou *lag* que corresponde ao sinal de fundo. A segunda fase, fase exponencial, com um aumento do declive da curva e uma terceira fase, estacionária ou *plateau* onde o declive é aproximadamente zero. A quantificação por PCR em tempo real ocorre na fase exponencial quando a quantidade de ADN amplificado atinge um ponto acima ao sinal de ruído. Ao número de ciclos da reação onde a fluorescência ultrapassa o limiar é denominado de *Cycle Threshold* (Ct) (8). Em condições ideais, o Ct é inversamente proporcional à quantidade de sequência alvo no início da reação (28).

A quantificação do teor de material GM numa amostra por PCR em tempo real pode ser aferida de duas formas diferentes (8). O método Cq comparativo faz uma comparação entre a quantidade da sequência alvo do OGM com a sequência do gene de referência. A curva padrão é obtida através do uso de amostras, por exemplo, de materiais de referência certificados com diferentes concentrações conhecidas. O valor do teor de OGM é obtido pelo cálculo do ΔCq ($\Delta Cq = Cq_{\text{gene de referência}} - Cq_{\text{OGM}}$). Este método requer que as eficiências de amplificação tanto para o alvo como o gene de referência sejam semelhantes (8).

O método da curva-padrão utiliza 2 curvas de padrão com diferentes quantidades de ADN. Uma curva com um sistema de quantificação para uma sequência específica de um evento OGM e uma segunda curva com um sistema de quantificação para o gene de referência. Para cada amostra, as quantidades do alvo específico e do gene de referência são calculadas por interpolação com a respetiva curva-padrão. A quantificação do material GM é calculada como a razão entre a quantidade de ADN alvo e de ADN do gene de referência, como é apresentada na seguinte expressão:

$$\text{OGM (\%)} = \frac{\text{ADN (GM)}}{\text{ADN (referência)}} \times 100 \quad (8)$$

Atualmente, o PCR em tempo real é o método eleito para a deteção e quantificação de material GM.

1.5.2. Métodos de deteção baseado na análise de proteínas

São vários os métodos baseados na análise de proteínas que podem ser utilizados, porém as estratégias de reconhecimento de proteínas mais usadas baseiam-se em imunoensaios (8) Estes permitem a deteção/quantificação através da interação específica entre o anticorpo-antigénio. A técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e os dispositivos de fluxo lateral (LDF) são dois exemplos das técnicas mais utilizadas. Alusivo a OGM, os antigénios são as novas proteínas sintetizadas por um gene introduzido durante a modificação genética. Relativamente aos anticorpos, podem ser utilizados monoclonais (alta especificidade) ou policlonais, dependendo do grau de especificidade de deteção, isto é, caso a deteção seja realizada para a proteína completa ou apenas para péptidos específicos (31).

Os imunoensaios são excelentes para a deteção de proteínas em géneros alimentícios crus, no entanto, é importante referir que a alteração genética induzida nem sempre conduz à produção de uma nova proteína e nem sempre os níveis de expressão proteica são suficientes para uma deteção fiável o que é desvantajoso. Para além disso, devido à degradação das proteínas, o uso deste método não é o adequado para amostras processadas (8).

1.5.2.1. ELISA

A nova proteína expressa por um determinado OGM é detetada pelo desenvolvimento de cor que ocorre quando se dá a formação do complexo anticorpo-antigénio.

Há dois tipos de testes que podem ser realizados em placa de micropoços ou em formato de tubo revestido. O formato ELISA mais utilizado é o direto do tipo sandwich, a placa de micropoços está revestida com um anticorpo monoclonal específico à superfície e ao adicionar a amostra que contém o antigénio, ocorre a ligação do complexo anticorpo-antigénio. Os antigénios que não se ligaram são eliminados com a solução de lavagem. É adicionado um anticorpo policlonal marcado com uma enzima, formando o complexo anticorpo-antigénio-anticorpo acoplado com uma enzima. Por fim, quando este complexo entra em contacto com o substrato da enzima acoplada ocorre a alteração de cor e está é medida por espectrofotometria (8,32).

1.5.2.2. Dispositivos com tiras de fluxo lateral

Uma variação da técnica ELISA, onde numa tira de nitrocelulose estão imobilizados dois anticorpos específicos para a proteína nova expressa e acoplados a um reagente de cor. A tira apresenta duas linhas de anticorpos, uma de controlo e uma de teste (específica para o analito alvo). Caso a amostra contenha o analito de interesse, há formação do complexo anticorpo-antigénio e aparece uma banda corada na linha de teste assim como na linha de controlo. Caso a amostra for negativa para a presença do analito alvo, apenas a banda da linha de controlo aparece corada (8). É um tipo de teste adequado como rastreio inicial na cadeia alimentar, isto porque, a deteção de OGM é realizada de forma rápida e barata. Contudo, a comercialização de dispositivos com tiras de fluxo lateral está limitada para apenas alguns produtos GM (8).

1.6. Alvos a analisar

A cada ano que passa o número de diferentes plantas GM que são cultivadas à escala comercial tem aumentado e é acompanhada por um aumento da variedade de modificações genéticas. Para o cumprimento dos requisitos da legislação, a deteção e identificação são cada vez mais complexas, sendo necessários métodos mais sensíveis (33). Os testes "screening" baseiam-se na identificação de sequências muitas vezes utilizadas no desenvolvimento de OGM. Na maioria das vezes, como rastreio inicial, o promotor 35S e o terminador NOS são os primeiros elementos regulatórios a serem detetados, uma vez que a maioria dos produtos vegetais GM contém um ou ambos. Para além destes, o promotor FMV-35S também é analisado neste relatório.

O CaMV é um vírus da família *caulimovirus* de ADN de cadeia dupla circular com capacidade de provocar dano nas plantas, tratando-se assim de um agente patogénico. Uma das suas sequências reguladoras, o promotor 35S, é amplamente usado no desenvolvimento de novas variedades de culturas vegetais com características vantajosas. O CaMV 35S é o promotor transcricional mais utilizado como vetor de inserção de genes em plantas, pela sua capacidade de controlar a transcrição de genes em plantas sem ajuda de qualquer coadjuvante (34).

O terminador de transcrição do gene da nopalina sintase (NOS) da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* encontra-se em muitas das culturas vegetais geneticamente modificadas. É uma sequência de ADN com cerca de 127 pb.

De acordo com o ISAAA, cerca de 66% dos produtos GM comercializados contém o promotor 35S e cerca de 54% contém o terminador NOS. Caso estejam presentes as duas sequências

reguladores o valor é igual a 81,4%. Isto comprova a importância destas sequências regulatórias na biologia vegetal (35).

O promotor FMV 35S pertencente à família dos vírus *Figwort mosaic* é muito parecido com a família do *caulimovirus* (36). É um vírus de ADN de cadeia dupla.

2. Objetivos

Validar e implementar a metodologia de PCR em Tempo real na deteção e quantificação de Organismos Geneticamente Modificados em alimentos, nomeadamente dos marcadores P-35s, T-nos e P-fmv.

3. Material e Métodos

3.1. Materiais de Referência Certificados

Na deteção e quantificação de OGM, os materiais de referência certificados (MRC) usados são extremamente importantes na validação e implementação dos métodos analíticos. Podem ser tanto usados como controlos positivos para aferir se a corrida de PCR está a funcionar corretamente ou para a calibração e controlo da qualidade da quantificação de OGMs (37,38) A escolha do MRC mais adequado está absolutamente relacionada com as amostras provenientes do teste de Controlo de Qualidade Externo. Como referido anteriormente, as amostras do CQ são milho e soja. Posto isto, o MRC referente à soja foi o GTS 40-3-2, ERM-BF410bp, em relação ao milho foi o BT11 com a referência ERM-BF412bk, ambos foram adquiridos no Joint Research Centre (JCR). Relativamente ao marcador P-fmv, adquiriu-se o OGM GT73, nº 5211501701, 100 cópias/ µl num volume de 150 µl de ADN genómico, proveniente da Eurofins GeneScan.

3.2. Amostras de Controlo de Qualidade Externo (CQE)

Para a realização da parte experimental deste estágio, foram analisadas amostras de soja e milho em diferentes estados físicos. Numa primeira fase, tínhamos como amostras farinha de milho e farinha de soja. Na segunda fase, farinha de milho e soja em grão eram as amostras.

3.3. Extração de ADN

A extração de ADN genómico das amostras de CQ utilizadas neste estudo foi efetuado com recurso ao Kit DNeasy® *mericon*® Food, da marca QIAGEN, nomeadamente o Protocolo Standard de 2 g. De acordo com as indicações do fabricante:

1. A tubo de Falcon que continha 2 g da amostra homogeneizada, adicionou-se 10 ml de *Food Lysis Buffer* e 25 µl de *Proteinase K*;
2. Incuba-se a amostra a 60°C durante 30 minutos em constante agitação;
3. Centrifuga-se a 2500×g durante 5 minutos;
4. Pipeta-se 500 µl de Clorofórmio para um *ependorf*;
5. Cuidadosamente, transfere-se 700 µl do sobrenadante da amostra, proveniente do passo 3, para o *ependorf* que contém o Clorofórmio;
6. Coloca-se a amostra a vortexar durante 15 segundos e centrifuga-se a 14000×g durante 15 minutos;
7. Pipeta-se 350 µl de *Buffer PB* e 350 µl do sobrenadante para um novo *ependorf*;
8. Pipeta-se todo o volume de cada amostra para uma coluna rotativa. Centrifuga-se a 17900×g durante 1 minuto e descarta-se o fluxo que se encontra no reservatório;
9. Adiciona-se 500 µl de *Buffer AW2* à coluna rotativa, centrifuga-se a 17900×g durante 1 minuto e volta-se a descartar o conteúdo que se encontra no reservatório. Centrifuga-se novamente a 17900×g durante 1 minuto para garantir que a membrana está seca;
10. Transfere-se a coluna para um novo *ependorf* e pipeta-se 150 µl de *Buffer EB*. Incuba durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifuga-se a 17900×g durante 1 minuto;
11. Descarta-se a coluna rotativa;
12. Armazenam-se as amostras extraídas a -20°C.

3.4. Medição da Concentração de ADN e avaliação do Grau de Pureza

A medição da concentração de ADN extraído e do grau de pureza de cada amostra foram realizadas com o recurso ao *NanoDrop One*. Obteve-se uma concentração em ng/ μ l e o grau de pureza a A260/280.

O grau de pureza é o factor decisivo para a avaliação da qualidade do ADN extraído (39). É através da espectroscopia UV que permite medir a absorvância a dois comprimentos de onda diferentes. A 260 e 280 nm por se tratar da absorvância máxima de soluções como o ADN e proteínas, respetivamente. O rácio Abs260/Abs280 têm de estar situado entre os valores 1,8 e 2,0 para ser considerado puro, livre de contaminantes (37).

3.5. PCR em Tempo Real

Para amplificação e deteção dos ácidos nucleicos das diversas amostras foram realizadas através da técnica de PCR em tempo real com recurso a sondas TaqMan® (*Applied Biosystems*). Foram utilizados os primers e as sondas específicas para os alvos, P-35s, T-nos e P-fmv (40,41) Na placa de PCR, como controlo negativo foi utilizado um branco, com recurso a água, para garantir que a mix usada não tinha nenhuma contaminação. As reações de amplificação, que perfizeram um volume igual a 20 μ l /poço, continham 10 μ l de Taqman Universal Master Mix, 5 μ l de ADN, os respetivos sondas e primers dos marcadores P-35s e T-nos e do controlo interno 18 estão apresentados na tabela 1. Relativamente ao marcador P-fmv, as reações de amplificação, que perfizeram um volume igual a 25 μ l /poço, continham 12,5 μ l de Taqman Universal Master Mix, 1 μ l de ADN, os respetivos sondas e primers dos marcador P-FMV.

As condições de tempo e temperatura da reação de amplificação foram de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95 °C durante 15 minutos; ciclo de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos; um ciclo a 60 °C durante 1 minuto para promover o emparelhamento dos primers extensão; 45 ciclos. A amplificação foi efetuada num termociclador QuantStudio™5-96-well0,1-mlBlock Applied Biosystems da Thermo Fisher e analisada com recurso ao software QuantStudio™ Design e Analysis V1.5.1.

Tabela 1– Sequências de Primers e Sondas utilizadas, bem como os volumes pipetados para cada poço

Primer/Sonda	Concentração Final (μM)	Sequência 5'–3'	Tamanho de amplificação (pb)	Volume por poço (μl)
P-35S- F	10	GCC TCT GCC GAC AGT GGT	83	0,4
P-35S- R	10	AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C		0,4
P-35S- FAM	10	FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA		0,2
T-nos-F	10	ACA TGC TTA ACG TAA TTC AAC AG	95	0,6
T-nos-R	10	TCA AAC ATT TGG CAA TAA AGT TTC		0,6
T-nos-ROX	10	ROX-AAT CCT GTT GCC GGT CTT GCG AT-BHQ2		0,2
18s- F	10	TGG TGC CAG CAG CCG C		0,5
18s-R	10	TCC AAC TAC GAG CTT TTT AAC TGC A		1,5
18s-HEX	10	HEX-CGC TAT TGG AGC TGG AAT TAC C		0,33
P-fmv-F	10	CAA AAT AAC GTG GAA AAG AGC T	78	0,85
P-fmv-R	10	TCT TTT GTG GTC GTC ACT GC		0,85
P-fmv-ROX	10	ROX-CTG ACA GCC CAC TCA CTA ATG C- BHQ		0,3

3.6 Limite de Detecção e de Quantificação

Para implementação de um novo método no laboratório é necessário, precedentemente verificar se este pode ser utilizado para finalidade pretendida. Na verificação do método validado para a detecção quantitativa e qualitativa de Organismos Geneticamente Modificados, há parâmetros a serem analisados e os respectivos critérios de aceitação. A estimativa do limite de quantificação (LOQ) e do limite de detecção (LOD) são dois dos parâmetros que foram analisados.

O limite de detecção é a concentração mais baixa do analito que pode ser detetada (42). Para a estimativa do limite de detecção, utiliza-se um MRC com baixa concentração de OGM que pode ser medido e a partir dessa concentração realizam-se 10 replicados de PCR e caso o sinal for positivo para cada uma dos replicados, considera-se como LOD relativo inferior ou igual a essa concentração. De acordo com o critério de aceitação, o LODrel deve ser inferior a 0,045% m/m com um nível de confiança de 95% (43).

Relativamente ao procedimento do LOQ, são efetuadas uma série de diluições do MRC com quantidades conhecidas de cópias/reação e são realizadas 10 replicados de PCR (43). Calcula-se o Desvio-padrão relativo (RSDr) e caso este seja inferior a 25% pode-se afirmar que o LOQ é igual ao LOD.

4. Resultados

Os resultados irão ser divididos em 2 subcapítulos, onde um se refere à implementação do método e o outro refere-se à validação do mesmo. Serão apresentados os resultados da detecção e quantificação dos marcadores P-35s, T-nos e P-fmv.

4.1 Implementação da técnica

A implementação de um novo método exige fases iniciais de desenvolvimento e otimização da técnica de forma a garantir que o método é o adequado para o objetivo pretendido.

De modo a otimizar a amplificação por PCR, foram efetuados replicados PCR com diferentes amostras e em diferentes condições. Para a implementação do método foram adquiridos os materiais de referência certificados, nomeadamente a soja GTS 40-3-2 e o milho BT11, sendo que ambos contém os marcadores P-35s e T-nos. Além disso, foi adquirido também o material de referência certificado a colza GT73 que continha o P-fmv. Iniciou-se o processo pela extração de ADN de cada um e procedeu-se à quantificação de ADN e verificação do grau de pureza a A260/A280. No caso da colza GT73, o material adquirido foi o ADN já extraído a uma concentração de 100 cópias/ μ l.

Tabela 2- Concentração de ADN e grau de pureza dos MRCs BT11 e GTS

	Concentração de ADN (ng/ μ l)	Grau de pureza (A260/A280)
Milho BT11	39,6	1,79
Soja GTS 40-3-2	60,8	1,82

Na figura 2 são apresentadas exemplos das curvas de amplificação para diferentes concentrações de material de referência com P-35s e T-nos.

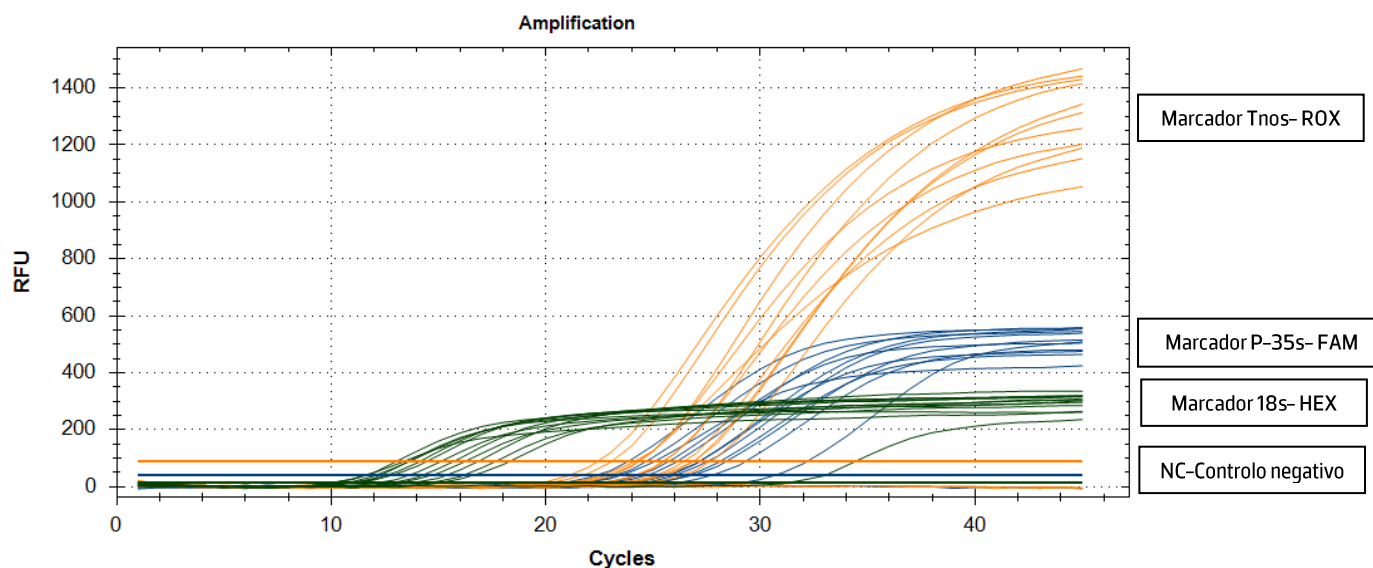


Figura 2- Curva de amplificação obtida com as amostras OGMs Farinha de Milho e Farinha de Soja e o respetivo controlo negativo

Na figura 3 são apresentados exemplos das curvas de amplificação para diferentes concentrações de material de referência com o evento GT73, nas condições de amplificação consideradas mais adequadas.



Figura 3- Curva de amplificação específica para o marcador P-fmv detetada no evento GT73 e o respetivo controlo negativo

Na figura 4 está apresentado as curvas de calibração de cada marcador, no qual se obteve os valores para o cálculo da eficiência e o R².

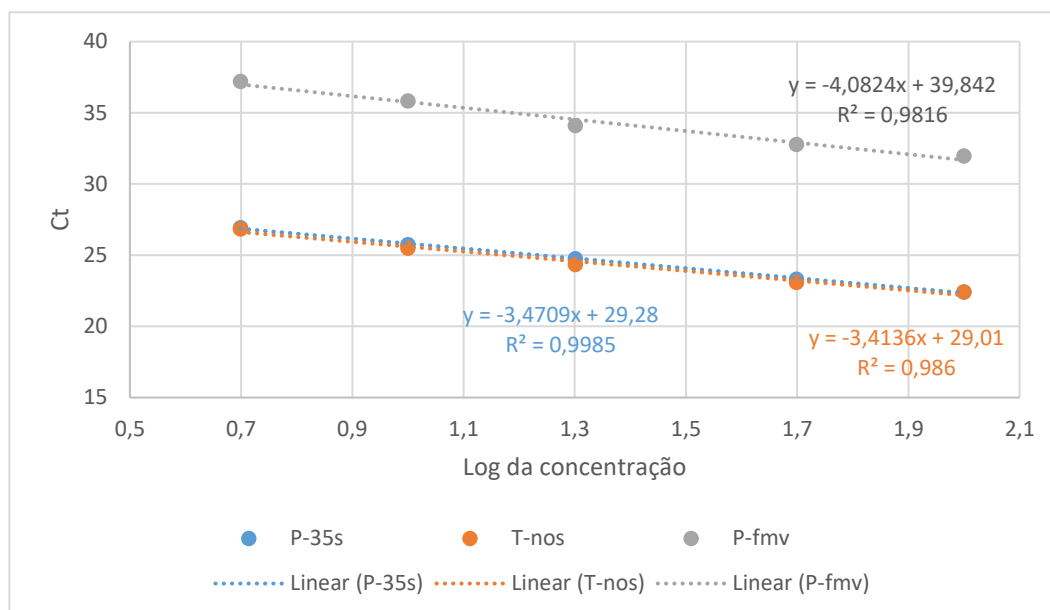


Figura 4– Curvas de calibração para os marcadores P-35s, T-nos e P-fmv

Na Tabela 2 estão apresentados os declives, as eficiências e o R² de cada marcador obtidas nos diversos ensaios de PCR em tempo Real.

Tabela 3– Ensaios de PCR em tempo real: declive, eficiência¹ e R² de cada marcador

Marcador	Declives	Eficiência (%)	R ²
P-35s	-3,47	102,214	0,99
T-nos	-3,41	96,451	0,98
P-fmv	-4,08	75,832	0,98

¹Eficiência (E) foi calculada de acordo com a fórmula $E = (10^{-1/\text{declive}} - 1) \times 100$ (44)

4.2. Validação do Método

Iniciou-se pela estimativa do LOD /LOQ para cada um dos marcadores (P-35s, T-nos e P-fmv). Para os marcadores P-35s e T-nos, efetuaram-se várias diluições em série de cada MRC. Foram efetuados 3 replicados de cada curva de calibração de acordo com o recomendado pelo European Network of GMO Laboratories (43).

Tabela 4- Valores de Ct para as diluições do MRC GTS 40-3-2

Quantidade de ADN por reação de PCR (ng)	%	Log	P-35s	T-nos
-	Branco	0	44	44
60,8	100	2	23,312	24,202
15,2	5	0,69897	27,865	28,761
6,08	2	0,30103	29,337	30,220
3,04	1	0	29,999	30,923
0,304	0,1	-1	32,214	32,249
0,0304	0,01	-2	35,527	36,414
0,0152	0,005	-2,30103	37,772	36,723
0,00304	0,001	-3	44	44

Como foi referido no ponto 3.6 do capítulo Material e Métodos, após conhecer a concentração mais baixa para a qual havia amplificação para os dois marcadores, efetuaram-se 10 replicados com essa concentração de acordo com o recomendado pelo European Network of GMO Laboratories (43).

Tabela 5- Valores de Ct para a % de 0,005

Quantidade de ADN por reação de PCR (ng)	%	P-35s	T-nos
-	Branco	44	44
0,0152	0,005	37,720	38,685
0,0152	0,005	38,216	39,343
0,0152	0,005	38,513	37,492
0,0152	0,005	36,939	35,678
0,0152	0,005	38,302	36,141
0,0152	0,005	37,772	36,723
0,0152	0,005	36,462	37,631
0,0152	0,005	38,450	37,727
0,0152	0,005	36,811	34,347
0,0152	0,005	37,225	35,495

Tabela 6– Valores da média, desvio padrão e do desvio padrão relativo (RSD_r) para os dois marcadores

	P-35s	T-nos
Média	37,641	36,926
Desvio-padrão	0,704	1,460
RSD_r	1,870	3,953

Considerando que todos os replicados da amplificação com 15,2 pg de ADN amplificaram a 100 %, então o LOD será inferior a 15,2 pg para os marcadores P-35s e T-nos. Visto que o RSD_r de cada marcador deu um valor inferior a 25 %, e de acordo European Network of GMO Laboratories considera-se o LOQ igual a LOD, sendo assim LOQ é igual a 15,2 pg.

Para além dos MRCs milho Bt11 e Soja GTS, foi ainda adquirido o MRC colza GT73. Este evento tinha como alvo genético o P-fmv 35s. Não foi realizada a extração de ADN pois este foi adquirido num volume de ADN genómico de 150 µl, com concentração de 100 cópias/µl. Foram realizados vários replicados PCR para determinar o LOD e LOQ do marcador P-fmv. O material de referência certificado foi diluído em série e obteve-se os seguintes valores.

Tabela 7– Valores de Ct para as diluições do MRC GT73

Amostra (cópias/reação)	Log Concentração	Ct
Branco	0	44
100	2	31,970
50	1,69897	32,765
20	1,30103	34,099
10	1	35,828
5	0,69897	37,201
1	0	44

De acordo com a norma estabelecida para o cálculo do LOD/LOQ (43), efetuaram-se 10 replicados PCR para a menor concentração no qual o marcador amplificava (5 cópias/reação) e obteve-se os seguintes resultados.

Tabela 8- Repetibilidade do método de PCR na concentração de 5 cópias/reacção do GT73

Nº de Repetições	Ct	média ± desvio-padrão	Desvio-padrão Relativo
Ensaio 1	34,081	35,251 ± 0,583	1,652
Ensaio 2	36,081		
Ensaio 3	35,244		
Ensaio 4	34,400		
Ensaio 5	35,405		
Ensaio 6	35,134		
Ensaio 7	35,743		
Ensaio 8	35,453		
Ensaio 9	35,786		
Ensaio 10	35,180		

O LOD do marcador P-fmv será igual a 5 cópias/reacção. Considera-se novamente o LOQ igual ao LOD, visto que o valor do RSD_r deu inferior a 25 %.

Para a validação do método, foram analisadas as amostras do controlo de qualidade externo (BIPEA). As amostras do CQE tem apenas disponíveis os marcadores P-35s e o T-nos.

Numa 1ª circulação de amostras de Controlo Qualidade Externo, a farinha de milho e farinha de soja eram as amostras a serem analisadas. O DNA foi extraído e obtiveram-se os seguintes valores de concentração e grau de pureza apresentados na tabela 9.

Tabela 9- Concentração de ADN e grau de pureza das amostras Farinha

	Concentração de ADN (ng/ µl)	Grau de pureza (A260/A280)
<i>Farinha de milho CQ</i>	38,4	1,82
<i>Farinha de soja CQ</i>	44,6	1,77

Após a extração, efetuou-se a reacção de qPCR, que permite-nos averiguar se o marcador estava presente ou ausente na amostra. Apenas o marcador T-nos na amostra de Farinha de Milho, não estava presente, pois não houve amplificação.

Tabela 10- Valores de Ct dos marcadores P-35s e T-nos

	Ct (P-35s)	Ct (T-nos)
<i>Farinha de milho CQ</i>	30,73	-
<i>Farinha de soja CQ</i>	26,08	26,90

Após verificar a detecção dos alvos a analisar nas duas amostras e com os resultados obtidos seguiu-se com a quantificação de cada marcador. Para isso, foram feitas curvas de calibração com os MRCs, tendo-se obtido os valores da tabela 12. (No Anexo A está apresentada a curva de calibração para o marcador 18s)

Tabela 11- Valores de Ct para os marcadores P-35s, T-nos e 18S na Farinha de Soja e Farinha de Milho

Farinha de Milho				Farinha de Soja				
ng/ μ l	Log (ng/ μ l)	Ct P-35s	Ct 18s	ng/ μ l	Log (ng/ μ l)	Ct P-35s	Ct T-nos	Ct 18s
3,04	0,4829	27,78	14,46	1,98	0,2967	26,93	26,85	14,99
6,08	0,7839	26,66	13,06	3,96	0,5977	25,74	25,50	13,54
12,16	1,0849	25,63	12,06	7,92	0,8987	24,75	24,34	12,70
30,4	1,4829	24,33	10,40	19,8	1,2967	23,32	23,08	10,89
60,8	1,7839	23,55	9,85	39,6	1,5977	22,41	22,41	10,77

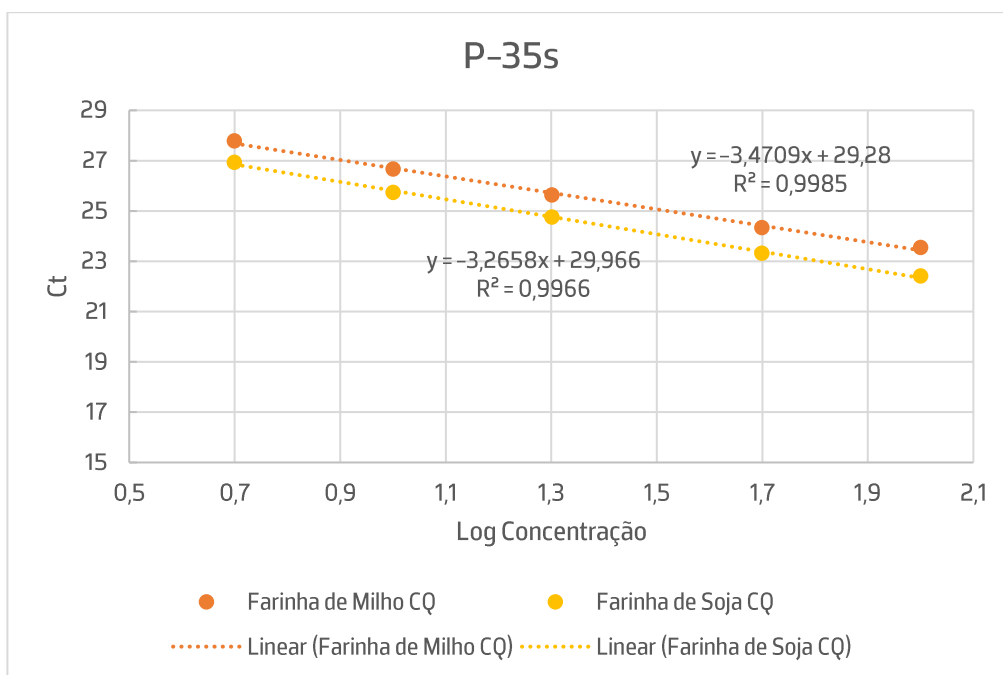


Figura 5- Curva de calibração para o marcador P-35s em função do logaritmo da quantidade de ADN nas amostras Farinha de Soja e Farinha de Milho

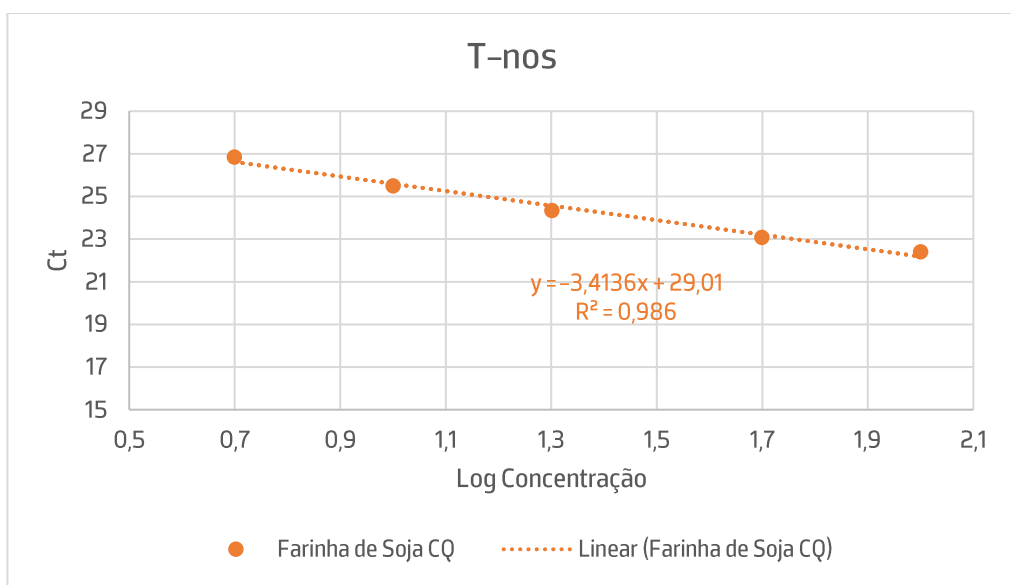


Figura 6– Curva de calibração para o marcador T-nos em função do logaritmo da quantidade de ADN nas amostras Farinha de Soja

A quantificação de cada marcador foi realizada recorrendo às curvas de calibração obtidas. Na impossibilidade de utilizar primers/sondas específicas para a Soja e para o Milho, utilizou-se o gene 18s que serve de indicador, não apenas da abundância do produto, mas também da eficiência amplificação.

Tabela 12– Equações da reta de cada marcador; Valores de Ct para cada marcador e a sua concentração final em %

	marcador	Equação da reta	Ct	Concentração final %
Farinha de Soja	P-35s	$y = -3,2658x + 29,966$ $r^2 = 0,9966$	26,08	8,4
	T-nos	$y = -3,4136x + 29,01$ $r^2 = 0,986$	26,90	4,2
	18s	$y = -3,31349x + 16,919$ $r^2 = 0,9825$	10,65	100
Farinha de Milho	P-35s	$y = -3,4709x + 29,28$ $r^2 = 0,9985$	30,73	0,77
	18s	$y = -3,6001x + 16,789$ $r^2 = 0,9863$	10,02	76

Por análise dos resultados obtidos da 1ª circulação, foram enviados três resultados. Em relação à matriz Farinha de Soja, o resultado para o marcador P-35s foi considerado como insatisfatório. O valor deu superior ao valor esperado pelo CQE. No que diz respeito ao marcador T-nos, não se obteve nenhuma avaliação por falta de resultados estatisticamente representativos na circulação. Relativamente, à matriz Farinha de Milho apenas o marcador p-35s foi amplificado e o resultado obtido foi tido como satisfatório, o T-nos foi confirmado como negativo. Os coeficientes de correlação (r^2) das curvas padrão dos marcadores bem como do controlo interno foram próximos de 1, ao que tudo indica, de um modo geral, os resultados obtidos são adequados.

Numa 2ª circulação, as amostras analisadas eram a Farinha de Milho e Soja em Grão. Foi realizado o mesmo procedimento que na 1ª circulação. Iniciou-se pela extração de DNA e a sua quantificação, assim como a medição do grau de pureza.

Tabela 13–Concentração de ADN e grau de pureza das amostras Farinha de Milho e Soja em Grão

	Concentração de ADN (ng/ μ l)	Grau de pureza (A260/A280)
<i>Farinha de Milho CQ</i>	27,5	1,8
<i>Soja em Grão CQ</i>	22,7	1,79

De seguida, procedeu-se com realização de vários replicados de PCR de modo a verificar quais dos marcadores amplificavam nas amostras. Obteve-se os seguintes valores.

Tabela 14– Valores de Ct de P-35s e T-nos

	Ct (P-35s)	Ct (T-nos)
<i>Farinha de milho CQ</i>	30,953	-
<i>Soja em Grão CQ</i>	-	-

Verificou-se que apenas o marcador P-35s amplificou na amostra Farinha de Milho CQ. Realizou-se o mesmo procedimento que na 1ª circulação para aferir a quantidade de P-35s na amostra Farinha de Milho.

Tabela 15- Valores de Ct para os marcadores P-35s e 18S na matriz Farinha de Milho

Farinha de Milho			
ng/μl	Log (ng/μl)	Ct P-35s	Ct 18s
3,04	0,4829	27,733	14,821
6,08	0,7839	26,441	12,558
12,16	1,0849	25,623	12,000
30,4	1,4829	24,413	11,671
60,8	1,7839	22,915	10,433

Com os valores acima apresentados, foram feitas curvas de calibração para os marcadores P-35s e 18S, no qual se obteve as equações da reta de calibração apresentadas nos gráficos (Anexo A) onde obteve-se os seguintes valores.

Tabela 16- Equações da reta de cada marcador; Valores de Ct para cada marcador e a sua concentração final em %

	marcador	Equação da reta	Ct	Concentração final %
Farinha de Milho	P-35s	$y = -3,5624x + 30,15$ $r^2 = 0,99$	30,953	0,4
		$y = -3,098x + 28,296$ $r^2 = 0,99$	30,127	
	18s	$y = -2,88341x + 16,16$ $r^2 = 0,8749$	10,403	100

O resultado obtido nesta 2ª circulação é considerado como satisfatório, visto que o valor obtido está em concordância com o valor recebido pelo teste do CQE.

Na tabela 17 é apresentado um resumo das 2 circulações do Controlo de Qualidade Externo. A concentração experimental diz respeito à concentração obtida a partir dos ensaios efetuados em laboratório. A concentração do CQE corresponde ao valor da concentração válido por parte do teste do CQE. A parcela denominada de Resultado está relacionada com a conformidade dos resultados obtidos em relação ao valor do teste do CQE.

Tabela 17- Valores da concentração experimental de cada marcador; concentração de cada marcador do CQE

1ºFASE	Marcador	Concentração experimental	Concentração do CQE	Resultado
Farinha de Milho	P-35s	<1	0,5 ± 0,1	Satisfatório
	T-nos	4,2	3,4 ± 0,2	Não Avaliado
Farinha de Soja	P-35s	8,4	2,2 ± 0,5	Insatisfatório
	T-nos	4,2	3,4 ± 0,2	Não Avaliado
2ºFASE				
Farinha de Milho	P-35s	0,4	0,4 ± 0,1	Satisfatório

5. Discussão

Na UE, a introdução no mercado de novos OGMs como géneros alimentícios requer a avaliação dos riscos adjacentes a estes bem como a sua segurança. A validação do método alusivo à deteção e quantificação de OGM representa uma parte fundamental de todo o processo que envolve a comercialização de OGM (45). Precedentemente à validação da técnica usado neste estágio laboratorial, iniciou-se pela sua implementação em laboratório e como já foi referido antes, o PCR em tempo real é a técnica eleita para a deteção e quantificação de OGM.

Na implementação de um novo método, o laboratório tem de assegurar que este é adequado para a finalidade a que se destina. Na verificação do método, o laboratório tem de avaliar os parâmetros e analisar se os resultados obtidos estão em conformidade com os critérios de aceitação apresentados na norma.

De um modo geral, os parâmetros relativos à amplificação dos marcadores (P-35s, T-nos e P-fmv) foram bastante satisfatórios. Relativamente à linearidade, podemos observar que os coeficientes de correlação (R^2) estão próximos de 1 e segundo o European Network of GMO Laboratories, estes deverão ser iguais ou superiores a 0,98 (45), sendo assim estão de acordo com o critério de aceitação apresentado na norma. Em relação à eficiência de PCR dos marcadores P-35s e T-nos, com uma eficiência igual a 102,2% e 96,5%, respetivamente, verifica-se que os valores são adequados, visto que estão incluídos no limite (entre 90 e 110 %) imposto pela norma(45). Acerca do marcador P-fmv, a sua eficiência é reduzida, com um valor igual a 75,8 %, pelo que deverá ser testada com outras amostras de OGMs com eventos que contenham este promotor, em todo o caso tendo em conta a sensibilidade obtida nada aponta para que se coloque em causa a sua utilização.

Durante a fase da implementação, para além da avaliação dos parâmetros acima referidos, procedeu-se à verificação da especificidade de cada conjunto de oligonucleótidos usados durante a fase de desenvolvimento do método. A especificidade permite demonstrar que o conjunto de primers e/ou sondas apenas reage com a sequência alvo (46). Posto isto, os marcadores (P-35s, T-nos e P-fmv) foram avaliados, testando-os contra amostras vegetais que não continham estes eventos e verificou-se que não houve amplificação, o que prova a especificidade do método.

Na validação do método, a estimativa do limite de detecção e do limite de quantificação são dois dos parâmetros que foram analisados. O procedimento para determinar o LOD e LOQ de cada um dos marcadores foi realizado de acordo com a informação que estava descrita no documento "Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods" (45).

O limite de detecção dos marcadores P-35s e T-nos, com um nível de confiança de 95%, foi de uma quantidade de ADN inferior a 15,2 pg/reação. Relativamente ao LOD Relativo, o critério de aceitação especificado na norma é para valores $<0,045\%$ m/m (45), sendo assim à quantidade de ADN igual 15,2 pg/reação corresponde a um LOD Relativo de 0,005 %, o que é indicador que o valor está de acordo com a norma. Em relação ao marcador P-fmv, verificou-se que a concentração menor para a qual havia amplificação correspondia 5 cópias/reação, e embora não seja possível comprovar o cumprimento da recomendação (em %m/m), esta eficiência deverá ser adequada para a detecção, tendo, no entanto, que ser comprovada testando amostras reais.

A estimativa do limite de quantificação foi realizada com base no desvio-padrão relativo (RSD_r). Os valores de RSD_r dos marcadores P-35s e T-nos são, 1,87 e 3,95, respetivamente. Segundo a norma, caso o RSD_r das medições efetuadas seja inferior a 25% então podemos afirmar que o LOQ é igual ao LOD (45). Visto que os valores obtidos são bastante inferiores a 25 %, o valor de LOQ será igual 15,2 pg/reação. No que diz respeito ao marcador P-fmv, a estimativa do LOQ segue a mesma lógica que os demais, uma vez que o valor de RSD_r é igual 1,65 e por consequência inferior a 25%, sendo assim o LOQ igual a 5 cópias/reação.

O controlo de Qualidade externo foi dividido em 2 circulações. A detecção e a quantificação dos marcadores P-35s e T-nos foram os parâmetros analisados. No que corresponde à detecção dos marcadores nas diversas amostras, não ocorreu nenhum tipo de erro de detecção. Na tabela 18 é apresentada para cada fase do CQE, as amostras analisadas e os marcadores, assim como os valores da quantificação obtidos e os valores do CQE.

Na 1ª circulação, no que diz respeito à amostra de Farinha de Milho, apenas o marcador P-35s foi detetado. Com um valor obtido inferior a 1, o resultado foi considerado como satisfatório. Como referido anteriormente foi na análise do marcador P-35s na matriz Farinha de Milho no qual se obteve o melhor coeficiente de correlação e a melhor eficiência.

Para a amostra Farinha de Soja foram detetados os dois marcadores. Embora as retas de calibração de todos os ensaios da matriz Farinha de Soja sejam satisfatórios, o resultado da única participação do CQE, onde existia um evento com o P-35s na matriz Farinha de Soja foi

insatisfatório. São necessárias mais circulações com estes eventos na matriz Soja para verificar se trata de um problema associado à matriz em, pois foi quantificado outras duas vezes de forma satisfatória. Relativamente ao marcador T-nos, o valor obtido durante a análise da amostra foi igual a 5,3, porém o valor enviado não foi avaliado por falta de resultados estatisticamente representativos nos participantes.

Na 2^o e última circulação, a Farinha de Milho foi a única amostra no qual apenas foi detetada o marcador P-35s. Após vários replicados de PCR, obteve-se um valor igual a 0,4 com um resultado satisfatório.

6. Conclusão

A produção e comercialização de produtos GM tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Os riscos provenientes do uso destes são analisados com bastante rigor pelas autoridades competentes. Como consequência do aumento de produtos GM e os seus derivados, o consumidor tem uma vasta gama de produtos à sua escolha e muitos destes podem originar efeitos nocivos ao Homem, Ambiente e ao Animal. Dessa forma, foi importante a criação de uma legislação que promovesse a segurança destes e garantisse ao consumidor uma escolha consciente.

Os objetivos de estudo, propostos inicialmente, foram cumpridos, o que permitiu a implementação da técnica de PCR em tempo real na deteção e quantificação de OGMs em alimentos.

O teste do Controlo de Qualidade Externo era a deteção e quantificação dos marcadores P-35s e o T-nos em diferentes matrizes de Milho e de Soja. Pelo facto de existirem uma grande diversidade de elementos GM, existem produtos OGM onde elementos regulatórios como o P-35s e o T-nos não estão presentes, implicando também à análise do P-fmv com o intuito de ampliar a gama de deteção. Os resultados do CQE sugerem que é possível a correta deteção e quantificação dos marcadores genéticos.

O trabalho aqui apresentado é essencial para a Saúde Pública, visto que muitos dos produtos que consumimos, atualmente, contém ou são derivados de OGMs e é expectável que estes não apresentem efeitos negativos e é a partir deste tipo de análise descrita neste trabalho experimental que é garantido a segurança de todos. Como perspetivas futuras pretende-se aumentar o número de marcadores genéticos em estudo que são utilizados na transformação genética de plantas. Além disso, o método de extração poderá ser aperfeiçoado com o propósito de se obter amostras mais puras.

Referências Bibliográficas

1. Lanigan TM, Kopera HC, Saunders TL. Principles of genetic engineering. Vol. 11, Genes. MDPI AG; 2020.
2. cellar_303dd4fa-07a8-4d20-86a8-0baaf0518d22.0010.02_DOC_1.
3. Feng J, Liang Y, Wang F, Chen J. Detection of genetically modified tomato using PCR coupled with μ parafluo Microfluidics Microarrays. J Nanosci Nanotechnol. 2013 Dec;13(12):8266–74.
4. Batista R, Oliveira MM. Facts and fiction of genetically engineered food. Vol. 27, Trends in Biotechnology. 2009. p. 277–86.
5. Holst-Jensen A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. Vol. 27, Biotechnology Advances. 2009. p. 1071–82.
6. Kuiper HA, Kleter GA, PJM Noteborn H, Kok EJ. Substantial equivalence*/ an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? [Internet]. Available from: www.elsevier.com/locate/toxicol
7. Rustgi S, Luo H. Biolistic DNA Delivery in Plants Methods and Protocols [Internet]. Available from: <http://www.springer.com/series/7651>
8. Querci M, Kagkli DM, Gatto F, Foti N, Maretti M, Mazzara M, et al. The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms : user manual
9. Ishii T. Crop Gene-Editing: Should We Bypass or Apply Existing GMO Policy? Vol. 23, Trends in Plant Science. Elsevier Ltd; 2018. p. 947–50.
10. Kawall K, Cotter J, Then C. Broadening the GMO risk assessment in the EU for genome editing technologies in agriculture. Vol. 32, Environmental Sciences Europe. Springer; 2020.
11. Kanchiswamy CN, Malnoy M, Velasco R, Kim JS, Viola R. Non-GMO genetically edited crop plants. Vol. 33, Trends in Biotechnology. Elsevier Ltd; 2015. p. 489–91.

12. Global Status of Commercialized biotech/GM Crops in 2019: biotech Crops drive Socio-economic development and Sustainable environment in the new frontier brief 55 executive Summary.
13. PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA Decreto do Presidente da República n. o 48/2005 de 21 de Setembro.
14. Relatório de Acompanhamento de 2022 [Internet]. Available from: www.dgav.pt
15. Agricultural Biotechnology.
16. James C. Global Area of Biotech Crops Million hectares. Source. 2014.
17. Tang G, Jian Q, Dolnikowski GG, Russell RM, Grusak MA. Golden rice is an effective source of vitamin A. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2009 Jan 6;89(6):1776–83.
18. Tsatsakis AM, Nawaz MA, Tutelyan VA, Golokhvast KS, Kalantzi OI, Chung DH, et al. Impact on environment, ecosystem, diversity and health from culturing and using GMOs as feed and food. Vol. 107, *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 108–21.
19. Bruetschy C. The EU regulatory framework on genetically modified organisms (GMOs). *Transgenic Res*. 2019 Aug 1;28:169–74.
20. CELEX_02003R1829-20210327_PT_TXT.
21. Naegeli H, Birch AN, Casacuberta J, De Schrijver A, Galak MA, Guerche P, et al. Guidance for the risk assessment of the presence at low level of genetically modified plant material in imported food and feed under Regulation (EC) No 1829/2003. *EFSA Journal*. 2017 Nov 1;15(11).
22. CELEX_02003R1830-20190726_PT_TXT.
23. Pansiot J, Chaouachi M, Cavellini L, Romaniuk M, Ayadi M, Bertheau Y, et al. Development of two screening duplex PCR assays for genetically modified organism quantification using multiplex real-time PCR master mixes. *European Food Research and Technology*. 2011 Feb 1;232(2):327–34.
24. Fraiture MA, Herman P, De Loose M, Debode F, Roosens NH. How Can We Better Detect Unauthorized GMOs in Food and Feed Chains? Vol. 35, *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 508–17.
25. Natonek-Wiśniewska M, Krzyścin P, Piestrzyńska-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*. 2013 Nov;34(1):69–78.

26. Engel KH, Moreano F, Ehlert A, Busch U. Quantification of DNA from genetically modified organisms in composite and processed foods. *Trends Food Sci Technol.* 2006 Sep;17(9):490–7.
27. Marmiroli N, Maestri E, Gulli M, Malcevschi A, Peano C, Bordoni R, et al. Methods for detection of GMOs in food and feed. Vol. 392, *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2008. p. 369–84.
28. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. Vol. 5, *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2005. p. 209–19.
29. Holst-Jensen A, Rønning SB, Løvseth A, Berdal KG. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2003. p. 985–93.
30. García-CAÑAS V, Cifuentes A, González R. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. Vol. 44, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2004. p. 425–36.
31. s0167-77992901920-5.
32. Malik K, Sadia H, Basit MH. Protein-Based Detection Methods for Genetically Modified Crops. In: *Protein-Protein Interaction Assays.* InTech; 2018.
33. Eugster A, Murmann P, Kaenzig A, Breitenmoser A. Development and validation of a P-35S, T-nos, T-35S and P-FMV tetraplex real-time PCR screening method to detect regulatory genes of genetically modified organisms in food. *Chimia (Aarau).* 2014 Oct 1;68(10):701–4.
34. Amack SC, Antunes MS. CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. Vol. 24, *Current Plant Biology.* Elsevier B.V.; 2020.
35. Wu Y, Wang Y, Li J, Li W, Zhang L, Li Y, et al. Development of a general method for detection and quantification of the P35S promoter based on assessment of existing methods. *Sci Rep.* 2014;4.
36. Figwort Mosaic Virus Properties of the Virus and Its Adaption to a New Host.
37. Querci M, Kagkli DM, Gatto F, Foti N, Maretta M, Mazzara M, et al. The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms : user manual.

38. Wu Y, Li J, Li X, Zhai S, Gao H, Li Y, et al. Development and strategy of reference materials for the DNA-based detection of genetically modified organisms. Vol. 411, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer Verlag; 2019. p. 1729–44.
39. Olson ND, Morrow JB. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Res Notes*. 2012;5.
40. Eugster A, Murmann P, Kaenzig A, Breitenmoser A. Development and validation of a P-35S, T-nos, T-35S and P-FMV tetraplex real-time PCR screening method to detect regulatory genes of genetically modified organisms in food. *Chimia (Aarau)*. 2014 Oct 1;68(10):701–4.
41. Official Compendium of Analytical Methods according to § 64 LFGB (Food and Feed law).
42. Klymus KE, Merkes CM, Allison MJ, Goldberg CS, Helbing CC, Hunter ME, et al. Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*. 2020 Jul 1;2(3):271–82.
43. Hougs L, Gatto F, Žel J. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods Version 2. 2017; Available from: <https://ec.europa.eu/jrc>
44. Tatti KM, Sparks KN, Boney KO, Tondella ML. Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4059–66.
45. Hougs L, Gatto F, Žel J. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods Version 2. 2017; Available from: <https://ec.europa.eu/jrc>
46. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. Vol. 37, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2014. p. 115–26.

Anexo A- Representação das curvas de calibração referenciadas no texto como figuras 7,8,9

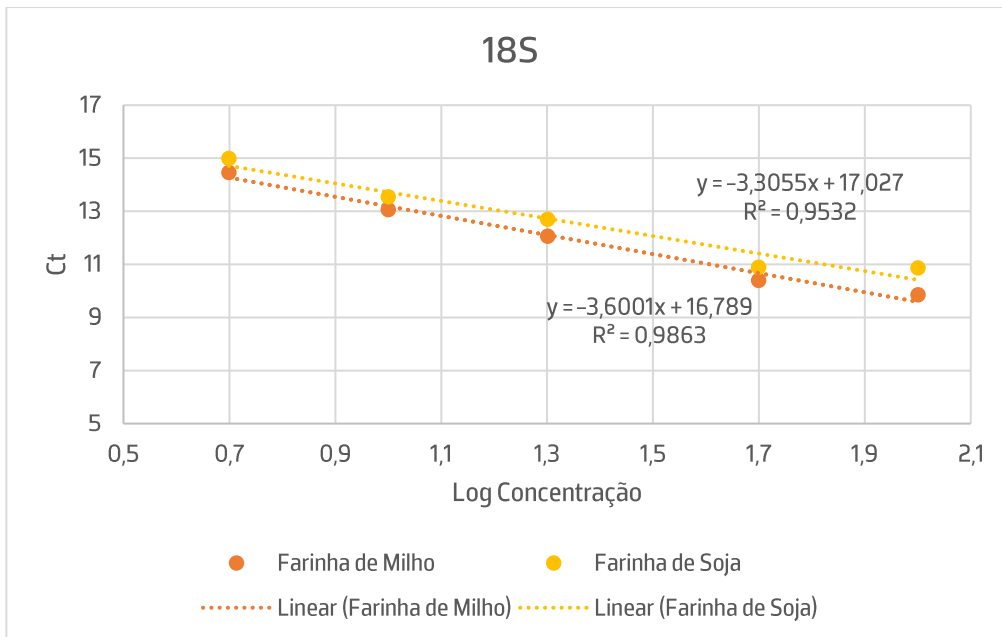


Figura 7– Curva de calibração para o gene 18S em função do logaritmo da quantidade de ADN nas amostras Farinha de Soja e Farinha de Milho

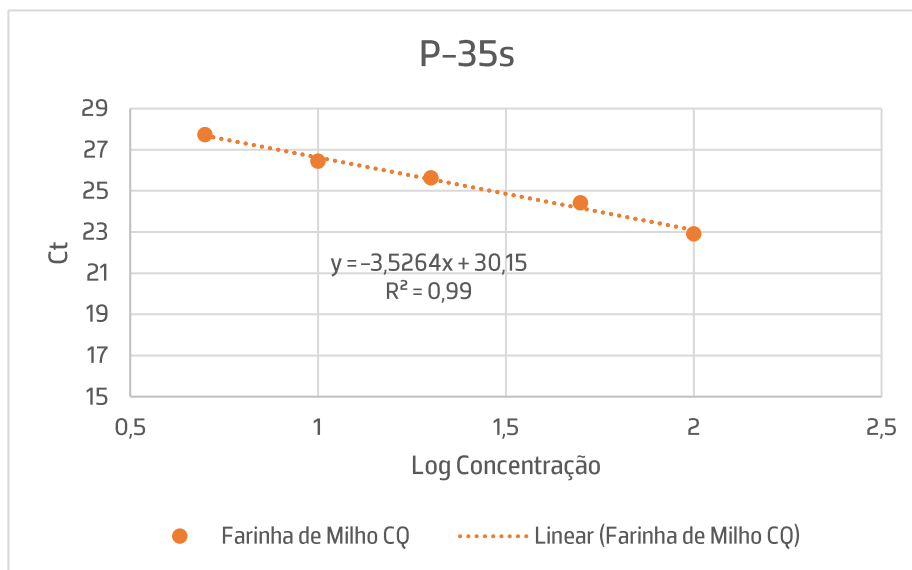


Figura 8– Curva de calibração para o marcador P-35s em função do logaritmo da quantidade de ADN na amostra Farinha de Milho

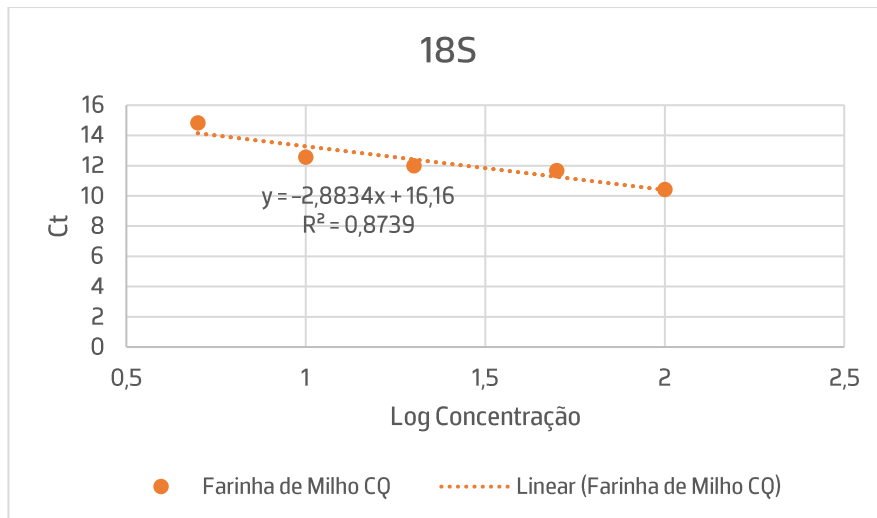


Figura 9– Curva de calibração para o marcador 18S em função do logaritmo da quantidade de ADN na amostra Farinha de Milho