



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDOS DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA E DE
ACELERADORES DE ELÉTRONS NA DETECÇÃO DE GRÃOS DE
MILHO (*Zea mays*) GENETICAMENTE MODIFICADO.**

RICARDO GANDARA CREDE

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

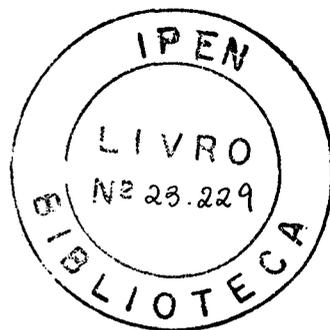
Orientadora:
Dra. Anna Lúcia C. H. Villavicencio

São Paulo
2005

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDOS DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA E DE
ACELERADORES DE ELÉTRONS NA DETECÇÃO DE GRÃOS DE
MILHO (*Zea mays*) GENETICAMENTE MODIFICADO.**

RICARDO GANDARA CREDE



Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Anna L.C. H. Villavicencio

São Paulo
2005

*Este trabalho é dedicado a todos aqueles
que fazem ou acreditam na ciência brasileira.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio pela amizade, carinho, estímulo, paciência, determinação e orientação não só neste trabalho, como também em outros momentos que passamos juntos.

Aos colegas de laboratório: Débora, Gustavo, Ingrid, Juliana, Mariana, Michel, Priscila, Reginaldo, Rosamaria e Simone, pelo alegre convívio diário.

Aos engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira, pela ajuda na irradiação das amostras no Centro de Tecnologia das Radiações.

Aos funcionários, pós-graduandos e estagiários do Centro de Tecnologia das Radiações, que fazem deste departamento um ótimo local de trabalho.

Ao IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, na pessoa do Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo gerente do CTR e da Dra. Maria Helena de Oliveira Sampa, chefe de pesquisa do CTR, pelo constante apoio financeiro do departamento que ajudou e colaborou no desenvolvimento deste trabalho, juntamente com a Fapesp.

Aos meus pais e meu irmão Rafael, que sempre me incentivaram ao desenvolvimento acadêmico.

Ao professor Crodowaldo Pavan, pelo excelente exemplo de vida e profissionalismo.

Aos professores e amigos Osmir Nunes e Glória Kreinz, pelo incentivo na área acadêmica.

Ao meu amigo e divulgador científico Mauro Celso Destácio pelo apoio e companheirismo.

Ao meu amigo Marcello Bittencourt, diretor da Rádio USP, pelos conselhos e dicas referentes ao mundo acadêmico.

Aos meus amigos e colegas do Núcleo José Reis de Divulgação Científica e da Rádio USP, com quem dividia meu tempo nos intervalos deste trabalho.

A todos aqueles que me deram forças e acreditaram em minha capacidade e persistência.

Muito Obrigado !

Segundo Albert Einstein
*“A ciência é uma coisa maravilhosa,
desde que você não tenha que ganhar a vida com ela”*
pode ser,
*“ mas sou brasileiro
e não desisto nunca”*

v

ESTUDOS DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA E DE ACELERADORES DE ELÉTRONS NA DETECÇÃO DE GRÃOS DE MILHO (*ZEA MAYS*) GENETICAMENTE MODIFICADO.

Ricardo Gandara Crede

RESUMO

A principal técnica para detecção de organismos geneticamente modificados – OGM's é a reação em cadeia pela polimerase ou polymerase chain reaction – PCR. A PCR é um método que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, utilizando-se dois iniciadores (“primers”) que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Para isso, o DNA é desnaturado (92-96°C), os “primers” são hibridizados (30° a 60°C) e posteriormente, a síntese de DNA é feita com uma DNA-polimerase e nucleotídeos (dNTPs) (72 °C), por vários ciclos repetitivos. O desenvolvimento da PCR permitiu enormes avanços na Biologia Molecular, principalmente para análise de genes, diagnóstico de doenças e patógenos, entre outros exemplos. Atualmente a PCR tem sido muito utilizada para a identificação de constituintes transgênicos em alimentos. Na detecção de grãos geneticamente modificados, a técnica de PCR mostrou-se altamente sensível, ela permite identificar um grão geneticamente modificado dentre um milhão de grãos normais. Hoje, a análise pelo método de PCR, é a única, em muitos casos capaz de discriminar um organismo geneticamente modificado de um não transgênico. A identificação de alimentos originários de grãos transgênicos, como soja e milho, através da técnica PCR ainda é polêmica. Sendo que o resultado do teste é mais confiável quando este é positivo. Ou seja, a ausência de detecção não significa que o produto não contenha, de fato, ingredientes transgênicos. Isso ocorre pelo fato de que para detectar uma seqüência de DNA, é preciso que este esteja minimamente preservado. Entretanto o que muitas vezes acontece no processo de industrialização, é que na manipulação dos ingredientes o DNA pode ser degradado (por exemplo, por calor ou radiação) e, com isso não ser mais detectável. Este trabalho visa como objetivo principal o estudo da viabilidade do uso da PCR na detecção de OGM's em alimentos irradiados contendo milho. Para a irradiação do material foi utilizada uma fonte de ⁶⁰Co Irradiador Gamma Cell-220 (Atomic Energy of Canada, LTD) e um acelerador de elétrons (radiation Dynamics Inc. USA), aplicando-se doses de 1, 25 e 50 kGy. Após a irradiação das amostras, os resultados da detecção foram comparados com amostras não irradiadas, mostrando que, quando utilizada a técnica da PCR, a irradiação não afeta a detecção de milho geneticamente modificado.

A STUDY ABOUT THE EFFECTS OF GAMA RADIATION AND ELECTRON BEAM IRRADIATION IN THE DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED MAIZE (*ZEA MAYS*) .

Ricardo Gandara Crede

ABSTRACT

The major technique to detect genetically modified organism – GMO is the polymerase chain reaction - PCR. The PCR is a method that allows the enlargement *in vitro* of DNA segments, using two starters (“primers”) that hybridize with the opposing ribbons, in regions that match the segment to be amplified. For that, the DNA is disnaturated (92-96°C), the “primers” are hybridized (30° a 60°C) and, after that, the DNA synthesis is made with a DNA-polymerase and nucleotides (dNTPs) (72 °C), for some repetitive cycles. The development of the PCR allowed great advances in Molecular Biology, mainly for analysis of genes, diagnosis of illnesses and pathogens, among some other examples. Currently, the PCR has been very much used for the identification of transgenic constituents in foods. In the detection of genetically modified grains, the PCR technique showed to be highly sensitive, because it allows identifying one genetically modified grain amongst a million of normal grains. Nowadays, the analysis through the PCR method is the only capable to discriminate an organism genetically modified from a not transgenic one. The identification of foods that were made of transgenic grains, as soy and maize, through the PCR technique is still controversial. Therefore the result of the test is more trustworthy when it is positive. Or either, the detection absence does not mean that the product does not have, in fact, transgenic ingredients. It happens because to detect a DNA sequence, is necessary to preserve a minimum portion of the DNA. However, what happens many times in the industrialization process is that, in the manipulation of the ingredients, the DNA can be degraded (for example, for heat or radiation) and, consenquently, is not detectable any longer. This work has as a main objective the study of the viability in the use of the PCR in the detection of GMO's in radiated foods containing maize. For the irradiation of the material, a source of ⁶⁰Co Irradiator Gamma Cell-220 and electron beam irradiation (Radiation Dynamics Inc. USA) were used (Atomic Energy of Canada, LTD), applying doses of 1, 25 and 50 kGy. After irradiating the samples, the detection results were compared with non-irradiated samples, showing that, when the PCR technique, was used, the irradiation does not affect the perception of the genetically modified mayze.

SUMÁRIO

	Página
1- Introdução.....	1
2- Objetivos.....	10
3- Revisão da Literarura.....	11
-3.1- Uso e ação dos milhos geneticamente modificados.....	11
3.2- Detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos.....	15
3.3- Detecção baseada na presença de DNA.....	17
3.4- A rotulagem dos geneticamente modificados.....	20
-3.5- O desenvolvimento da irradiação de alimentos.....	23
-3.6- Uso da irradiação de alimentos.....	29
3.7- Aplicação das irradiações em grãos.....	31
3.8- Perdas na armazenagem de grãos.....	34
3.9- Importância econômica da produção de milho.....	36
4- Materiais e Métodos.....	40
4.1- Amostras.....	40
-4.2- Irradiação das amostras.....	41
-4.3- Controles positivos.....	43
4.4- Adequação das amostras.....	43
4.5- Extração do DNA das amostras.....	43
4.6- Primers.....	46
4.7- Visualização do DNA obtido.....	47
4.8- A reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	47
4.9- Programação do termociclador.....	48
4.10- A eletroforese dos produtos da PCR.....	49
5- Delineamento Experimental.....	51
6- Resultados.....	52
7- Discussão.....	62
8- Conclusões.....	69
9- Referências Bibliográficas.....	70

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Perdas por pragas em grãos armazenados nos principais commodities brasileiros.....	34
Quadro 2: Primers utilizados, nomes, funções, seqüências e segmento amplificado.....	47
Quadro 3: Resultado final das PCR's e sua equivalência com as amostras irradiadas.....	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Instalações de uma multinacional produtora de sementes geneticamente modificadas em São José dos Campos – SP.....	2
Figura 2: Foto do acelerador de elétrons Radiation Dynamics, pertencente ao IPEN.....	7
Figura 3: Fonte de Cobalto 60 – Gammacell 220 pertencente ao IPEN.....	8
Figura 4: A esquerda lagarta e direita, forma adulta de <i>Spodotera frugiperda</i>	12
Figura 5: forma adulta e uma lagarta de <i>Ostrinia nubialis</i> no colmo do milho.....	12
Figura 6: A esquerda lagarta e forma adulta de <i>Diatraea grandiosella</i> , a direita uma lagarta de <i>Heliothis zea</i> alimentando-se em uma espiga de milho.....	12
Figura 7: Irradiador semi-industrial multipropósito do Centro de Tecnologia das Radiações – CTR do IPEN/CNEN em São Paulo.....	28
Figura 8: Divisão do consumo de milho no Brasil.....	37

Figura 9: Produção média de milho do Brasil e dos principais estados produtores – 1998 a 2000 e 2001 a 2003.....	38
Figura 10: Exemplos de algumas amostras de milho utilizadas no experimento.....	41
Figura 11: Amostras devidamente embaladas para irradiação na Gammacell.....	42
Figura 12: Amostras nas embalagens para irradiação no acelerador de elétrons.....	42
Figura 13: Laboratório destinado ao processo de extração de DNA.....	46
Figura 14: termociclador utilizado, modelo Mastercycler (Eppendorf).....	49
Figura 15: Trabalho de foto-documentação para o registro dos resultados.....	50
Figura 16: Gel determinando insucesso (1,2) e sucesso (3-8) de uma extração de DNA.....	52
Figura 17: Armazenagem das amostras de DNA.....	54
Figura 18: PCR com primer IVR1, mostrando a presença ou ausência de milho.....	55

Figura 19: Amplificação através do primer IVR1, mesmo com doses de 50kGy.....	56
Figura 20: PCR com primer IVR1, utilizando-se amostras irradiadas em diferentes doses.....	56
Figura 21: Resultado de uma PCR para Bt176, não amplificação do controle positivo.....	57
Figura 22: Identificação de amostras possuidoras de milho Bt11.....	58
Figura 23: Identificação de amostras possuidoras de milho Bt11.....	58
Figura 24: Identificação de amostras possuidoras de milho MON810.....	59
Figura 25: esultado da PCR de amostras contendo milho Bt11 depois de irradiadas.....	60
Figura 26: Resltado da PCR de amostras contendo milho MON810 depois de irradiadas.....	60

1- Introdução:

A produção de alimentos transgênicos surgiu com o intuito de minimizar perdas e aumentar a produtividade dos cultivares. As culturas de variedades geneticamente modificadas, autorizadas são inúmeras: na Argentina, a soja em 1996, o milho e o algodão em 1998; no Canadá, o milho e o algodão em 1996, a canola em 1997, a soja e o melão em 1998, a batata e o trigo em 1999; nos Estados Unidos, o melão, a soja, o tomate, o algodão e a batata em 1994, a canola e o milho em 1995; no Japão, a soja, a canola, a batata e o milho em 1996, o algodão e o tomate em 1997; na União Européia, o tomate e a canola em 1995, a soja em 1996, o milho em 1997, a batata e o algodão em 1998. O mundo se encontra na era do supermercado transgênico, alimentos com os genes modificados chegam à mesa dos consumidores, como a cenoura mais doce e contendo doses extras de beta-caroteno, o arroz com mais proteínas, a batata com retardo de escurecimento, o melão com maior resistência a doenças, o milho resistente a pragas, a soja com genes de castanha-do-pará que aumenta o seu valor nutritivo, o tomate longa vida, que foi o primeiro alimento transgênico a ser comercializado e a ervilha com genes que permitem sua conservação por mais tempo (GREINER, 1999). O desenvolvimento de novos produtos transgênicos e o crescimento da biotecnologia na produção de novos cultivares é inevitável. Para o Brasil, a legislação adotada em relação a tecnologia dos organismos geneticamente modificados – OGM's, será de grande importância, influenciando diretamente no futuro da produção agrícola nacional (Folha de São Paulo, 2004). O ato de proibir os transgênicos é impedir o progresso científico, econômico e social do país (PAVAN, 2005).

A biotecnologia e engenharia genética como novas tecnologias para a cadeia produtiva, em particular para as companhias oligopólicas desse mercado, são propagadas sob o argumento de não agredirem o ambiente e contribuirão para a saúde, inclusive por contribuirão para o fim do uso de pesticidas e da fome no

mundo (CAVALLI, 2001). Os alimentos geneticamente modificados, bem como a biotecnologia, sustentam-se sobre tais argumentos e pela disputa entre corporações do mercado internacional pelos produtos oriundos destas tecnologias, modificando o comércio e o controle específico das cadeias agro-alimentares do cenário mundial. As maiores discordâncias sobre transgênicos ocorrem entre os Estados Unidos, que é o maior exportador de produtos desenvolvidos por engenharia genética através de multinacionais (figura 1), e a Europa, que, juntamente com a maioria dos países do terceiro mundo, temem que as lavouras de OGM's - organismos geneticamente modificados, tenham efeitos devastadores sobre a biodiversidade e as tradições culturais de suas populações (HOFFMAN, 1999).



Figura 1: Instalações de uma multinacional americana produtora de sementes geneticamente modificadas em São José dos Campos – SP.

Greiner (1999) destaca os principais argumentos da rejeição dos alimentos transgênicos na Europa: inexistência da necessidade de produzir alimentos a partir de engenharia genética, riscos, mesmo se considerados hipotéticos; aspecto cultural; efeitos de longo prazo que devem ser estudados e risco ambiental. Uma série de riscos dos alimentos transgênicos para a saúde está sendo levantada e questionada, por grupos contrários aos OGM's, que questionam o aumento das alergias,

resistência aos antibióticos, aumento das substâncias tóxicas e dos resíduos nos alimentos. Com relação à segurança alimentar em prol do bem estar da população, é necessário um aprofundamento nas pesquisas, para que se possa consumir esses alimentos sem riscos a saúde (SPERS e KASSOUF, 1996). Questiona-se a garantia da segurança e qualidade alimentar nutricional dos produtos, bem como, da solução da fome, isto é, como chegar a superação do problema alimentar no mundo. A segurança alimentar pressupõe o direito fundamental de acesso quantitativo e qualitativo de alimentos. Alguns grupos, julgam que não está nos alimentos transgênicos a solução para a erradicação da fome, bem como do oferecimento de segurança alimentar para a população (SILVA, 2000).

Atualmente são muitas as variedades geneticamente modificadas de milho (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, 2004). Entre elas pode-se destacar:

- Milho Bt176: produzido pela Syngenta (ex-Novartis), é geneticamente alterado de forma a produzir o seu próprio pesticida, tornando-se assim resistente a alguns insetos.

- Milho Bt11: linhagem resistente a insetos e tolerante a herbicidas, produzido pela empresa Syngenta.. Possui a proteína inseticida Cry1Ab, isolada da bactéria *Bacillus thuringiensis* subsp. Kustaki cepa HD1; e a proteína herbicida acetil transferase (PAT), isolada da bactéria *Streptomyces viridochromogenes*.

- Milho MON810: desenvolvido pela empresa Monsanto, este cultivar possui resistência a insetos, através da presença da proteína inseticida Cry1Ab.

- Milho T25: linhagem tolerante a herbicida Liberty Link T25, contendo a proteína herbicida PAT e produzido pela empresa Aventis/Bayer.

A identificação destes cultivares geneticamente modificados, pode ser realizada pela técnica da PCR – reação em cadeia pela polimerase (ROMANO, 1999). A invenção desta técnica deu a Kary Mullis o Nobel de Química de 1993. A PCR é um método que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, utilizando-se dois iniciadores (“primers”) que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Para isso, o DNA é desnaturado (92-96°C), os “primers” são hibridizados (30 a 60°C) e posteriormente, a síntese de DNA é feita com uma DNA-polimerase e nucleotídeos (dNTPs) (72°C), por vários ciclos repetitivos (IKUNO, 2000).

Quando foi inicialmente concebida, a PCR era uma tarefa tediosa uma vez que as mudanças sucessivas de temperatura requeriam a transferência manual dos tubos de reação entre os banhos-maria com temperaturas diferentes. Além disso, a DNA polimerase devia ser acrescentada a cada ciclo, pois a temperatura elevada para a desnaturação do DNA molde, desnaturava também esta enzima. Duas inovações fizeram com que a PCR se tornasse tão simples, fácil e eficiente de modo que se utilizasse em laboratórios do mundo todo. A primeira foi a purificação de uma DNA-polimerase obtida de uma bactéria termófila (*Thermus aquaticus*), que habita fontes de água quente. A *Taq*DNA polimerase permanece ativa mesmo após sucessivos ciclos de amplificação. Além disso, foram desenvolvidos termocicladores automáticos, que controlam os sucessivos ciclos de aumento e diminuição de temperatura, requeridos para a PCR (IKUNO, 2000).

O desenvolvimento da PCR permitiu enormes avanços na Biologia Molecular, principalmente para análise de genes, diagnóstico de doenças e patógenos, entre outros exemplos. Atualmente a PCR é muito utilizada para a identificação de constituintes transgênicos em alimentos (HIRATA, 1999). Na detecção de grãos de soja geneticamente modificados, a técnica de PCR mostrou-se altamente sensível, ela permite identificar um grão de soja geneticamente

modificada dentre um milhão de grãos normais. O tempo necessário para a análise pela técnica da PCR, gira em torno de 1,5 dias. Hoje, em muitos casos, a análise pelo método da PCR, é a única técnica capaz de discriminar um organismo geneticamente modificado de um grão não transgênico (GACHET, 1999).

Recentemente pesquisas realizadas na Europa utilizando-se a técnica PCR demonstraram a existência de alimentos contendo grãos transgênicos no Brasil. Tais pesquisas encomendadas por entidades brasileiras como o IDEC - Instituto de Defesa do Consumidor, foram realizadas na Europa pelo fato de não existir ainda no Brasil laboratórios conceituados na Tecnologia da PCR para a identificação de alimentos transgênicos ou produzidos com matéria prima oriunda de organismos geneticamente modificados (Folha S.Paulo, 21/06/2000). Apesar da grande polêmica ocasionada pela chegada ao mercado brasileiro da soja transgênica Roundup Ready, produzida pela multinacional Monsanto, contendo o transgene CP4 EPSPS, ainda não possuímos maiores estudos referentes a grãos transgênicos e seus produtos industrializados (SILVA, 2000).

Além disso a identificação de alimentos originários de grãos transgênicos, como soja e milho, através da técnica PCR ainda é polêmica. Sendo que o resultado do teste somente é confiável quando este é positivo. Ou seja, a ausência de detecção não significa que o produto não contenha, de fato, ingredientes transgênicos (DICKINSON, 1995). Isso ocorre pelo fato de que para detectar uma sequência de DNA, é preciso que este DNA esteja minimamente preservado. O que muitas vezes acontece no processo de industrialização, é que na manipulação dos ingredientes o DNA pode ser degradado e, com isso não ser mais detectável por técnicas de biologia-molecular como a PCR (GREINER, 1998).

Os consumidores têm que saber se o alimento que consomem é seguro, independentemente de como ele é produzido ou desenvolvido. Por ser uma

tecnologia recente, ainda não houve tempo para a realização de um bom número de trabalhos científicos envolvendo os organismos geneticamente modificados em relação as mais diversas áreas do conhecimento humano (CAVALLI, 2001). Faltam, estudos que avaliem a sua atividade na economia mundial, sua importância nutricional, seus possíveis impactos ambientais e sua relação com outras tecnologias utilizadas na indústria alimentícia (BINSFELD, 2000).

A relação do uso de radiação ionizante em alimentos que contem em sua composição os organismos geneticamente modificados é um destes pontos obscuros. Ainda não existem linhas de pesquisa ou trabalhos publicados sobre a interação destas duas tecnologias que são capazes de atuar sobre a constituição do DNA de produtos alimentícios. O termo radiação refere-se aos processos físicos de emissão e propagação de energia, seja por intermédio de fenômenos ondulatórios, seja por meio de partículas dotadas de energia cinética. A irradiação é o processo de aplicação desta energia a um material, tal como os alimentos, com a finalidade de esterilizá-los ou preservá-los pela destruição de parasitas, insetos e outras pragas, redução da carga microbiana, inibição de brotamento e prolongamento da vida útil (FDA, 1997). O tipo de radiação usada é a denominada radiação ionizante, pois ela produz partículas eletricamente modificadas (íons). O emprego das radiações ionizantes gama e feixe de elétrons, na preservação de alimentos está crescendo mundialmente. A grande diferença entre os raios gama provenientes de uma fonte de Co^{60} e os elétrons oriundos de um acelerador industrial, é o seu poder de penetração (DIEHL, 1995). Enquanto os feixes de elétrons atingem poucos centímetros de profundidade, a capacidade de penetração dos raios gama é maior (URBAIN, 1986). Isso faz com que os aceleradores de elétrons (figura 2) só possam ser usados em produtos com pouca espessura, garantindo assim a adequada irradiação do material.

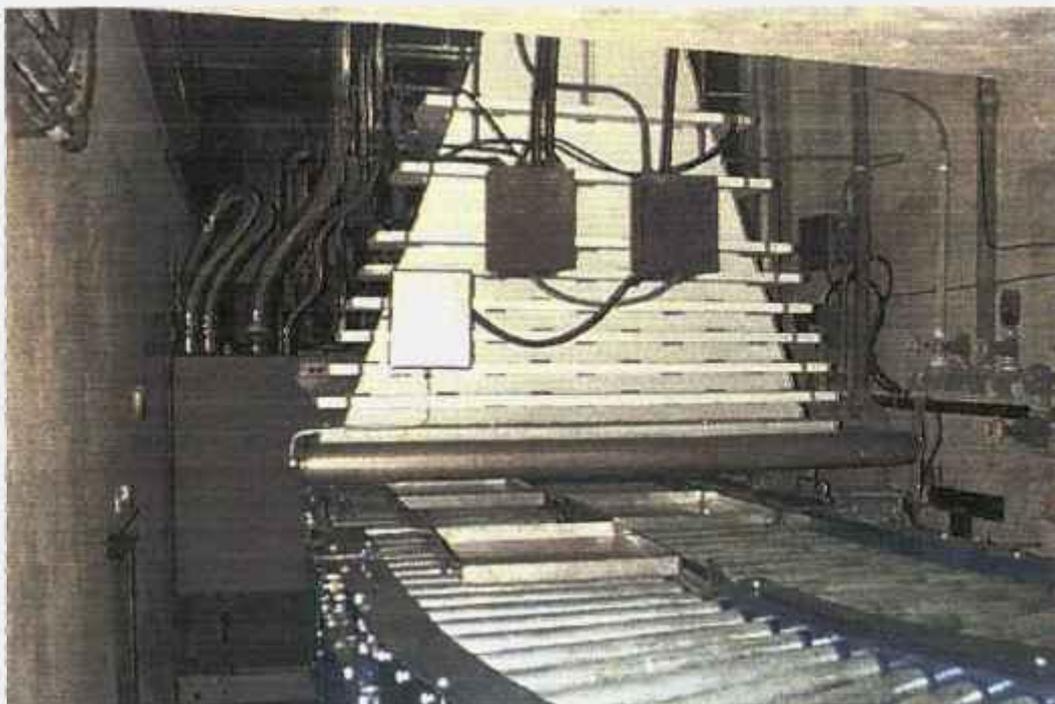


Figura 2: Foto do acelerador do elétrons Radiation Dynamics, pertencente ao IPEN.

Nem todos os tipos de radiação são apropriados para o processamento de alimentos, assim sendo a FAO/OIEA/OMS publicou as normas gerais do Codex para alimentos irradiados (Codex Alimentarius, 1983; US.Food. 1986; DIEHL, 1995; ICGF, 1995). A irradiação dos alimentos constitui importante método capaz de diminuir as perdas econômicas provenientes da deterioração e a eliminação de patógenos, aumentando o nível de segurança dos alimentos e favorecendo a aceitação dos produtos exportados pelos países em desenvolvimento (LOAHARANU, 1994). Nos dias atuais, a irradiação de alimentos contribui imensamente no controle dos perigos microbiológicos (AN-HUNG FU *et al.*, 1995). Apesar do alto nível de segurança dos produtos alimentícios fornecidos para consumo, os perigos e riscos microbiológicos continuam existindo, resultando em números expressivos nas estatísticas de incidência de enfermidades transmitidas por alimentos (DIEHL, 1995).

As perdas de alimentos em grandes quantidades devido à deterioração constituem importante problema que atinge, principalmente, países em

desenvolvimento. Estima-se que cerca de 50% dos produtos perecíveis como carne, peixes, frutas e vegetais, sejam perdidos antes de atingirem o consumo final (VILLAVICENCIO, 1998). Grande parte das perdas ainda se deve à infestação de insetos, deterioração, amadurecimento natural e por alterações fisiológicas como o brotamento de tubérculos, contribuindo, diretamente, para agravar os problemas de fome e desnutrição da população, gerando em consequência a diminuição da produtividade e aumentando a predisposição a enfermidades. Na esfera do comércio internacional, são interpostas barreiras fitossanitária dificultando a exportação de alimentos (DIEHL, 1995). Pesquisas envolvendo o tratamento com irradiação, principalmente a oriunda do Cobalto 60 (figura 3) estão sendo desenvolvidas a fim de sanar diversos destes problemas.



Figura 3: Fonte de Cobalto 60 – Gammacell 220 pertencente ao IPEN.

O uso de radiação ionizante no processamento de alimentos é possível graças a existência de algumas características relacionadas a molécula de DNA (DELINCÉE, 2002). A irradiação em doses incapazes de modificar as características naturais dos alimentos e afetar as demais moléculas celulares, já são suficientes para alterar o DNA, provocando sua quebra e destruição (POLLARD, 1966). Os efeitos da quebra do DNA em alimentos processados por radiação são mostrados por diversos autores, sendo inclusive uma das formas de detectar se um alimento foi irradiado ou não (VILLAVICENCIO, 2000). Neste trabalho: “ESTUDOS DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA E DE ACELERADORES DE ELÉTRONS NA DETECÇÃO DE GRÃOS DE MILHO (*Zea mays*) GENETICAMENTE MODIFICADO” foram estudadas as possíveis conseqüências da radiação na molécula de DNA, o que poderia interferir na detecção de milhos geneticamente modificados através da técnica da PCR.

2- Objetivos

Este trabalho teve como principais objetivos:

- Avaliar os efeitos da radiação gama de ^{60}Co e de aceleradores de elétrons na detecção de variedades de milho geneticamente modificado ou de alimentos que o possuam como ingrediente.
- Desenvolver uma rotina laboratorial na identificação de organismos geneticamente modificados.
- Avaliar as atuais técnicas de PCR na identificação de grãos geneticamente modificados e suas possíveis falhas a partir de alimentos processados.

3 – Revisão da Literatura

3.1- Uso e ação dos milhos geneticamente modificados

Com o advento da biotecnologia, genes que codificam proteínas com propriedades inseticidas foram isolados de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Estes genes foram modificados para expressarem adequadamente em plantas, para o controle de pragas alvo em culturas como o tomateiro, *Lycopersicon esculentum* (Fishhoff *et al.*, 1987); algodoeiro, *Gossypium hirsutum* (PERLAK *et al.*, 1990); batata, *Solanum tuberosum* (Perlak *et al.*, 1993); e milho, *Zea mays* (KOZIEL *et al.*, 1993 e ARMSTRONG *et al.*, 1995). O milho geneticamente modificado, resistente a insetos, foi originalmente desenvolvido para o controle de *Ostrinia nubialis* (Lepidoptera), uma importante praga do colmo do milho nos Estados Unidos. As proteínas *Bt* são eficientes, principalmente, no controle de espécies de ordens Lepidoptera e Coleoptera. Em plantas geneticamente modificadas, as lagartas se alimentam de tecido foliar e ingerem a proteína *Bt* que atua nas células epiteliais do tubo digestivo das mesmas (MEYERS *et al.*, 1997). A proteína *Bt* promove a ruptura osmótica irreversível das células e causa a morte dos insetos, antes que os mesmos consigam causar danos econômicos à cultura (PETRANTONIO *et al.*, 1993).

Koziel *et al.* (1993) obtiveram sucesso na inserção do gene *CryIAb* em milho, sendo a proteína *CryIAb* expressa em altas concentrações nos tecidos da planta. Os autores, em teste de campo, observaram eficiência no controle de *Ostrinia nubialis*, tanto em relação aos consumo de folhas, quanto à perfuração do colmo da planta. Armstrong *et al.* (1995) avaliando o potencial de várias linhagens de milhos geneticamente modificados, no controle de *Ostrinia nubialis*, (fig.5) verificaram excelentes resultados quanto à resistência das plantas testadas a esta praga, levando à conclusão de que plantas geneticamente modificadas devem ser mais um componente de manejo integrado de pragas (MIP).



Figura 4: A esquerda lagarta e a direita, forma adulta de *Spodoptera frugiperda*.



Figura 5: Forma adulta e uma lagarta de *Ostrinia nubilalis* no colmo do milho.

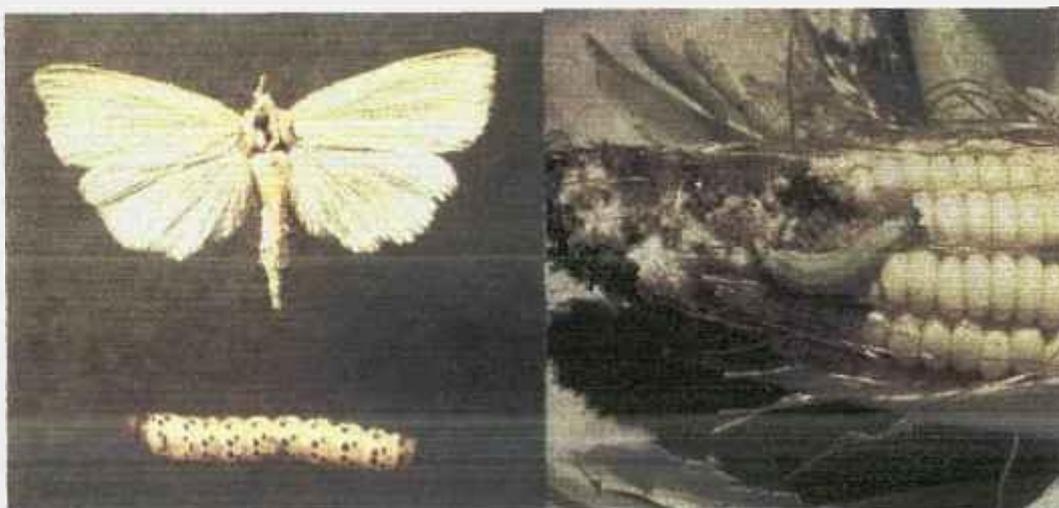


Figura 6: A esquerda lagarta e forma adulta de *Diatraea grandiosella*, a direita uma lagarta de *Heliothis zea* alimentando-se em uma espiga de milho.

A resistência de diversos híbridos de milho geneticamente modificado, contendo a proteína *Cry1Ab*, às lagartas de *Spodotera frugiperda* (figura 3) e *Diatraea grandiosella* (figura 4) foi avaliada em bioensaios de laboratório e testes de campo por Williams *et al.* (1997). Em laboratório, utilizou-se o tecido vegetal liofilizado adicionado à dieta artificial para avaliar o efeito da proteína *Bt* nos lepidópteros. Observaram baixa sobrevivência das duas espécies em dieta com tecido liofilizado dos híbridos de milhos modificados. Em campo, os híbridos geneticamente modificados apresentaram menores danos. Os estudos demonstraram a ação tóxica da proteína *Cry1Ab* para *Spodotera frugiperda* e *Diatraea grandiosella*. Lunch *et al.* (1999) em teste de campo com milho doce Bt11 (proteína *Cry1Ab*), confirmaram os efeitos adversos da proteína presente nas folhas e espigas no desenvolvimento biológico de *Spodotera frugiperda* e de *Heliothis zea*. Os dados de campo indicaram adequada proteção de folhas e espigas aos danos destas pragas no milho Bt11.

Barry *et al.* (2000) efetuaram testes de campo, com milhos resistentes, que expressavam as proteínas *Cry1Ab* e *Cry1Ac*, com o objetivo de avaliar os efeitos dos mesmos em populações de *Ostrinia nubilalis* e *Diatraea grandiosella*. As plantas resistentes apresentaram significativa redução de danos nas folhas e nos colmos, em relação ao milho convencional. Buntin *et al.* (2001) avaliaram a eficácia dos milhos MON810 e Bt11, que expressam a proteína *Cry1Ab*, no controle de *Spodotera frugiperda* e *Heliothis zea* na safra de 1998. Ambos os milhos consistentemente reduziram as infestações e danos nos cartuchos e nas espigas das plantas, respectivamente para *Spodotera frugiperda* e *Heliothis zea*. Os autores observaram, no entanto, que apesar de significativa redução na infestação dos lepidópteros, lagartas de ambas as espécies se estabeleceram em várias espigas do milho modificado, embora tenham se desenvolvido mais lentamente e causando menor dano, em relação ao milho convencional. Os autores concluíram que os milhos

MON810 e Bt11 foram efetivos em evitar significativas perdas na produtividade devido ao ataque de ambas as pragas.

No Brasil, Martinelli (2001) avaliou o padrão de resistência dos milhos geneticamente modificados Bt11 e ICP4, que expressam proteínas *Bt*, para *Spodotera frugiperda* e *Heliothis zea*, em condições de campo. De acordo com os dados obtidos foi possível observar danos em folhas de milho modificado, porém em nível reduzido comparativamente ao milho convencional. Os danos nas folhas ocorreram mais precocemente no milho convencional do que nos milhos Bt11 e ICP4, sendo que nestes a progressão da intensidade de dano foi acentuadamente menor que nos híbridos convencionais. O autor concluiu que ambos os milhos Bt11 e ICP4 foram eficientes na proteção da planta em relação ao dano de *Spodotera frugiperda* e de *Heliothis zea*.

Huang *et al.* (2002) avaliaram a performance de diversos milhos geneticamente modificados, que expressam proteínas *Bt*, no controle de *Ostrinia nubialis* em condições de telado. Os autores avaliaram o padrão de resistência dos milhos geneticamente modificados DBT418 que expressa a proteína *Cry1Ac* e MON810, Bt11 e Bt176 que expressam a proteína *Cry1Ab*, no controle deste crambídeo, utilizando populações selecionadas em laboratório para a resistência à formulação comercial *Bt*. Os tratamentos foram compostos dos milhos modificados e respectivos híbridos convencionais. A infestação artificial de *Ostrinia nubialis* foi efetuada nos estádios de 8 a 11 folhas, colocando-se 30 lagartas recém-eclodidas no cartucho das plantas. Os resultados indicaram que os milhos geneticamente modificados apresentaram diferentes padrões de resistência quanto ao dano nas folhas e colmo, bem como na sobrevivência das lagartas. Os milhos MON810 e Bt11 mostraram-se mais consistentes quanto ao padrão de resistência, protegendo as folhas e colmos das plantas e determinando baixíssima sobrevivência dos insetos, inclusive da população mais resistente.

Ensaio de campo foram conduzidos em 1997 e 1998 para avaliar a eficiência dos milhos MON810, MON802, Bt11 e Bt176 (proteína *Cry1Ab*), DBT418 (proteína *Cry1Ac*) e CHB351 (proteína *Cry9c*) no controle de lagartas de *Ostrinia nubilalis* no terceiro, quarto e quinto instares, em diferentes estádios fenológicos do milho (WALKER *et al.*, 2000). Infestações artificiais foram efetuadas colocando-se manualmente duas lagartas dos diferentes instares em distintos estádios fenológicos da planta. Os resultados indicaram que os distintos milhos apresentaram diferentes padrões de proteção da planta às infestações e danos da praga. Os milhos MON810, MON802, Bt11 e CHB351 foram eficientes no controle das lagartas, em todos os instares. O milho CHB351 não apresentou eficiência no controle das lagartas tanto na fase vegetativa quanto reprodutiva da cultura. Os autores concluíram que a expressão da proteína ao longo do desenvolvimento fenológico da planta pode determinar maior ou menor controle da praga.

Híbridos de milhos doce geneticamente modificados como milho Bt11 (proteína *Cry1Ab*), foram testados, em campo, para a avaliação da eficiência no controle de *Ostrinia nubilalis*, *Heliothis zea* e *Spodoptera frugiperda*. Os dados obtidos indicaram que o milho BT11 proporcionou consistente padrão de resistência, independente do complexo de pragas, densidade da praga e localização geográfica (BURKNESS *et al.*, 2002).

3.2- Detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos

A detecção de organismos geneticamente modificados pode ser baseada na presença de proteínas específicas. As novas proteínas que as plantas geneticamente modificadas expressam podem ser detectadas por métodos químicos ou imunológicos quer qualitativa quer quantitativamente. A detecção química de

proteínas transgênicas pode ser realizada utilizando cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) ou eletroforese capilar (CE) (PIETSCH, & WAIBLINGER, 2001).

Os organismos geneticamente modificados também podem ser detectados imunologicamente. Neste caso, as proteínas expressas podem ser detectadas nas matérias primas e em alguns alimentos processados usando imunoensaios, Western Blot ou ELISA (*enzyme linked immuno-sorbent assay*). No caso do Western Blot a proteína é extraída da amostra e é imobilizada numa membrana. As proteínas ligadas à membrana são imersas numa solução contendo um anticorpo que reconhece a proteína alvo. O anticorpo liga-se a uma enzima que catalisa a formação de um composto corado cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de proteína. Por exemplo, a proteína CP4 EPSPS expressa pela soja Roundup-Ready que confere tolerância ao herbicida Roundup (ROGAN *et al.*, 1999).

Nos ensaios de ELISA utiliza-se o mesmo princípio, mas o anticorpo está ligado ao plástico dos poços das microplacas em vez de se ligar a membranas. Um método para detecção e quantificação de soja geneticamente modificada, em alimentos e frações alimentares, usando materiais de referência, foi validado através de um ensaio inter-laboratorial, à escala europeia, coordenado pela AACC (American Association of Cereal Chemists, Inc.) para detecção e quantificação de milho MON810 que expressa a proteína inseticida *Cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis* (Bt), por um kit ELISA (LIPP *et al.*, 2000).

Em relação aos testes imunológicos, além dos já mencionados, existe ainda a possibilidade de se utilizar testes rápidos em tira "strip tests", que já estão sendo comercializados e que podem ser realizados, por exemplo, no local da colheita do cereal ou num silo. Estes testes são fáceis de utilizar, não são dispendiosos e

permitindo assim tomar decisões rápidas (STAVE & DURANDEUA, 2000; ILSI/AACC, 2002).

Em qualquer dos casos o nível de expressão das proteínas é o fator limitante para a utilização destes métodos, mas segundo Stave as proteínas transgênicas estão dentro do limite de detecção dos imunoenaios (STAVE, 1999). Nas análises baseadas na detecção de proteínas há ainda que ter em conta, que uma proteína transgênica pode não ser expressa ou ainda ser expressa em níveis muito baixos pelas partes da planta que são utilizadas em produtos alimentícios. Além disso, algumas seqüências de DNA introduzidas em cultivares não expressam proteínas, como nos casos já descritos na literatura de uma variedade de batata e uma variedade de tomate (MEYER, 1995).

3.3 - Detecção baseada na presença de DNA

Nas amostras em que existe DNA geneticamente modificado, todo o DNA exógeno é, em princípio, suscetível de ser detectado, ou seja: seqüências de promotores, genes de interesse introduzidos, sinais de terminação e genes marcadores usados para seleção das plantas modificadas em laboratório. Na União Européia, apesar da legislação permitir que a detecção seja baseada na presença de proteínas ou DNA, o DNA foi a molécula eleita para a detecção de organismos geneticamente modificados. A técnica utilizada nos laboratórios para a detecção do DNA é a PCR (WITWER, 2001).

A extração de DNA para análise de gêneros alimentícios e ingredientes alimentares geneticamente modificados é um ponto crítico para todos os passos analíticos subsequentes, tanto para a detecção qualitativa como para a análise quantitativa. Numerosos métodos de extração já foram testados. Estes métodos vão desde *kits* de extração comercializados, a métodos clássicos com maiores ou

menores alterações conforme o grau de processamento das amostras (ZIMMERMANN *et al.*, 1998). Tendo em conta que a reação da PCR pode ser inibida por substâncias contidas num alimento, como lipídios, ácidos graxos, polissacarídeos, entre outros, a escolha de controles de qualidade é determinante para se evitarem falsos negativos, este controle pode ser realizado por amplificação com “primers” universais para plastos vegetais ou específicos para o gene da invertase (IVR) no milho ou o gene da lecitina na soja (TABERLET *et al.*, 1991).

Existem diferentes protocolos aprovados na Europa para diferentes cultivares de acordo com a Diretiva 90/220/CEE. Assim a possibilidade de implementação de um método de rastreio que permita a detecção destas plantas, independentemente da variedade utilizada é muito importante para as autoridades de controle. Em 1997 foi publicado um método baseado na detecção de duas seqüências reguladoras existentes em 26 plantas transgênicas (LIPP *et al.*, 1999). Estas seqüências contêm fragmentos do promotor 35S CaMV (retirado do vírus do mosaico da couve flor) e do terminador NOS proveniente do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens*. Na Europa, métodos de detecção qualitativos para rastreio já foram validados por cinco ensaios inter-laboratoriais: dois organizados pelo Joint Research Centre - JRC, “Commission of the European Union, Institute for Health and Consumer Protection”, dois sob a coordenação do projeto Europeu DMIF-GEN – “Development of methods to indentify foods”, e um sob a coordenação Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin - BgVV (LIPP *et al.*, 2000)..

Devido à necessidade de identificar variedades específicas de plantas geneticamente modificadas foram desenvolvidos métodos que permitem aos laboratórios de controle realizar reações da PCR com “primers” específicos para diferentes organismos geneticamente modificados. A análise qualitativa dá uma indicação sobre a presença de um organismo geneticamente modificado autorizado,

mas para responder à necessidade de rotulagem é necessário um teste quantitativo subsequente. A rotulagem é necessária se for possível demonstrar, ao nível do ingrediente, que está presente mais do que 1% de OGM autorizado (PIETSCH, & WAIBLINGER, 2001).

Um método da PCR quantitativa competitiva (QC-PCR) já foi testado para análise de alimentos e matérias primas. Este método baseia-se na co-amplificação, no mesmo tubo de reação, do DNA padrão e do DNA alvo. O DNA padrão consiste num plasmídeo linearizado contendo fragmentos da PCR de um produto geneticamente modificado. Depois da reação da PCR os produtos são separados em um gel de agarose sendo o DNA padrão diferenciável do DNA alvo pelo tamanho do fragmento obtido. Se os critérios de validação forem atingidos, no ponto de equivalência as concentrações do padrão interno e do DNA alvo serão iguais. Com este método não se obtêm correlações lineares entre amostras de concentrações conhecidas, mas um conjunto de pontos de calibração com os quais as amostras desconhecidas são comparadas, daí que seja muitas vezes considerado um método semi-quantitativo (LAUTER, 2000).

Além de muito trabalhoso este método, é baseado na comparação visual ou instrumental de bandas as quais são por vezes difíceis de avaliar (VAN DEN EDEC *et al.*, 2000). Convencionalmente, a análise de produtos da PCR é um passo separado que ocorre depois da reação da PCR estar concluída. A eletroforese em gel de agarose é, nesse caso, utilizada para verificar o tamanho e pureza dos produtos obtidos. A técnica de análise dos produtos de PCR durante a amplificação tornou-se conhecida como PCR em tempo real (PCR *Real Time*). A forma mais simples de monitorar a PCR durante a amplificação é utilizando fluorescência. Se representando a fluorescência versus o número de ciclos, a acumulação de produtos de PCR, pode ser visualizada numa curva de crescimento, semelhante a uma curva de crescimento de uma bactéria. Monitorar a fluorescência durante cada ciclo é uma

forma muito adequada de quantificar o número de cópias obtidas. Muitas cópias do DNA molde deslocam a curva para a zona com número baixo de ciclos, poucas cópias deslocam a curva para o outro lado. A quantificação do DNA alvo é realizada medindo a fluorescência na fase linear logarítmica. A maioria das aplicações da PCR em tempo real, requerem unicamente um corante para cadeia dupla de DNA. Contudo, algumas aplicações requerem uma maior especificidade, podendo nesses casos ser utilizadas sondas marcadas com fluorescência para monitorizar a PCR. Essas sondas podem ser de hidrólise “TaqMan” ou de hibridização. Foram publicados recentemente métodos para quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares com soja Roundup Ready e milho Bt176 utilizando a PCR em tempo real (WITTWER, 2001).

Já foram realizados na Europa ensaios inter laboratoriais para PCR competitivo relacionada a soja e amostras comerciais contendo soja, sob a coordenação do projeto JRC, e sob a coordenação do BgVV. Da análise dos resultados destes métodos quantitativos verifica-se que são necessários mais dados para desenvolver e validar os métodos, com níveis elevados de precisão e exatidão. Nesta área, as dúvidas estão ainda nas diferenças existentes, ou não, entre os diferentes equipamentos disponíveis no mercado, nos parâmetros de validação, controle de qualidade analítico para certificação dos métodos, assim como no tipo de material de referência utilizado para realizar as curvas de calibração (LAUTER, 2000).

3.4 – A rotulagem dos geneticamente modificados

A rotulagem dos alimentos está prevista no Código de Defesa do Consumidor (Lei nº 8.078, de 11/09/90 _ art. 6º. III e art. 8º). Trata-se de uma norma para garantir ao cidadão a informação sobre um produto, permitindo-lhe o direito de

escolha. Além disso, ela possibilita a rastreabilidade, pois em casos de efeitos na saúde humana, os produtos rotulados seriam facilmente identificados e recolhidos. No Brasil, a fiscalização sobre a rotulagem está a cargo da Vigilância Sanitária. Contudo, a decisão e mesmo o conteúdo e outras características do rótulo estão no âmbito do Ministério da Justiça. O IDEC está representando os consumidores nesta rodada de negociações e fez sugestões para aparecer no rótulo não só a expressão "produto transgênico", mas também a característica e o nome do organismo doador do gene. É esperado ainda que o país normatize em breve a rotulagem dos produtos transgênicos ou que contenham ingredientes derivados de organismos geneticamente modificados (MOMMA, 1999)

Internacionalmente, existe um Grupo de Trabalho de Rotulagem que foi encarregado de preparar uma versão preliminar a ser discutida na reunião do *Codex Alimentarius*. Levando-se em consideração o ocorrido na Conferência de Partes da CDB – Convenção sobre Diversidade Biológica, pode ser que, as normas internacionais de rotulagem dos alimentos transgênicos ou com ingredientes de OGM, sejam aprovadas em uma das próximas reuniões do *Codex*. As plantas transgênicas, aprovadas para o cultivo comercial nos EUA, tiveram sua liberação baseada no princípio da equivalência substancial. Assim, a soja RR foi considerada "equivalente" à sua antecedente natural, a soja convencional, porque não difere desta nos aspectos cor, textura, teor de óleo, composição e teor de aminoácidos essenciais e em nenhuma outra qualidade bioquímica. Desta forma, não foram submetidas à rotulagem pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) encarregada de sua liberação (NODARI & GUERRA, 2003)

Este conceito de equivalência substancial tem sido alvo de críticas, porque, entre outras razões a falta de critérios mais rigorosos pode ser útil à indústria, mas é inaceitável do ponto de vista do consumidor e da saúde pública (MILLSTONE *et al.*, 1999). Equivalência significa dispor de igual valor ou outro atributo, normalmente expresso em unidades ou parâmetros: um grama do produto Y equivale a X energia.

Ela se refere sempre à quantidade ou algo mensurável a que corresponde um sentido tecnicamente comparável (MOMMA, 1999). Há, portanto, dificuldades práticas no conceito de equivalência entre plantas engenheiradas e naturais ou obtidas por técnicas convencionais de melhoramento genético, pois a rigor, genomicamente, elas não são equivalentes nem iguais. Só seriam iguais se uma fosse originária da outra por multiplicação vegetativa ou micropropagação. A construção genética inserida na planta contém elementos bastante distintos daqueles naturais encontrados nela, proporcionando novos produtos gênicos e podendo desencadear efeitos pleiotrópicos substanciais, e não podem, por isso, ser considerados desprezíveis (GACHET, 1999).

Esta estratégia (equivalência substancial) foi introduzida na década passada para evitar que as indústrias tivessem custos maiores com testes de longa duração, como ocorreu na área farmacológica. Quando se utiliza a equivalência substancial, nenhum teste é requerido para excluir a presença de toxinas prejudiciais, carcinogênicas e ou mutagênicas. Este princípio é equivocado e deveria ser abandonado em favor de testes biológicos, toxicológicos e imunológicos mais aprofundados e eficazes (GUERRA & NODARI, 2001). O procedimento em si não tem base científica.

Desta forma, o FDA exige apenas testes de curta duração com animais e testes bioquímicos para avaliar, entre outros, aspectos a alergenicidade. Esta insuficiência de dados, que não consegue subsidiar cientificamente a análise da segurança alimentar, está sendo questionada por várias organizações civis americanas (WILLIAMS, 1997).

3.5 – O desenvolvimento da irradiação de alimentos:

O primeiro documento na área sobre essa tecnologia data de 1905, quando, no Reino Unido, J. Appleby e A. J. Banks patentearam-na sob nº 1609. Na área alimentícia, o emprego da irradiação ionizante foi proposto considerando aspectos da conservação dos alimentos, principalmente cereais e seus produtos, com raios alfa, beta e gama provenientes de rádio ou outras substâncias radioativas. O fato de seu emprego tornar desnecessário o uso de substâncias químicas na conservação de alimentos foi considerado marcante na nova tecnologia. Entretanto, as preparações com rádio, sugeridas como fonte de radiação, não existiam em quantidade suficiente para a irradiação comercial de alimentos. Em 1920, quinze anos após essa primeira investida, Schwartz, do United State Department of Agriculture (USDA) Bureau of Animal Industry, sugeriu o uso de raio-X para inativar o parasita *Trichinella trichinae* em carne de porco. Entretanto, persistia o problema de insuficiência de material para ser usado como fonte na irradiação comercial de alimento (DIEHL, 1990).

Somente nos anos 40, após a Segunda Guerra Mundial, essas fontes tornaram-se viáveis, sendo possível reduzir os custos do processo. Mas a idéia de se utilizar a radiação para o tratamento de alimentos já não era nova. Já em 1930, na França, Würst patenteou uma invenção assim descrita por ele: “Todos os alimentos acondicionados em embalagens metálicas são submetidos à ação de raios X (alta voltagem) para destruir bactérias”. Entretanto, a patente nunca foi colocada em prática, provavelmente devido à indisponibilidade de grandes fontes de radiação que viabilizassem comercialmente o processo. Em 1947, o interesse pelo assunto voltou à tona graças à uma publicação sobre o tema de Brasch e Huber (1947), co-inventores de um acelerador de elétrons pulsante, o Capacitron. Para eles, as carnes e outros produtos alimentícios, poderiam ser esterilizados por pulsos de elétrons de alta energia, enquanto em outros produtos, como leite e seus derivados, o

desenvolvimento de sabores e aromas estranhos impedia o seu uso. Já nessa época foi sugerida a retirada do oxigênio da embalagem para minimizar o problema. Esses pesquisadores foram mais além ao considerarem o parâmetro custo – benefício: “a irradiação não elevará o preço final do produto” (BRASCH e HUBER, 1947).

Enquanto isso, outros estudos foram desenvolvidos nos Estados Unidos pelo Massachusetts Institute of Technology (MIT). Estas pesquisas serviram como base para a revisão sobre o tema realizado por Proctor e Goldblith (1951), que concluíram que a irradiação com nêutrons produz radioatividade no alimento. O uso de raios ultravioleta (UV) e partículas alfa foi descartado, devido ao baixo poder de penetração e os raios X, em consequência da baixa eficiência das máquinas geradoras. Portanto, sobraram apenas os aceleradores de elétrons, então denominados raios catódicos. Os raios gama de isótopos radioativos não chegaram a ser mencionados, provavelmente porque não havia isótopos adequados, como ^{60}Co e ^{137}Cs , em quantidade comercial. Foi nessa época que, nos Estados Unidos, o Programa “Atoms for Peace” sob a coordenação da United States Atomic Energy Commission (USAEC), atual Atomic Energy Department, financiou diversas pesquisas com raios gama nas universidades americanas. Primeiramente, esses raios eram fornecidos por combustível exaurido de reatores nucleares. Mas, por problemas relacionados com a dosimetria, as instituições acadêmicas passaram a ser supridas com fontes de ^{60}Co . Entre elas, na década de 50, podem ser citados o MIT, University of California, Davis, University of Washington, Seattle, e, mais recentemente nos anos 60, a University of Florida, Gainesville (DIEHL, 1990).

No Reino Unido, já no início da década de 50, pesquisas eram iniciadas e incentivadas a partir do sucesso dos experimentos nos Estados Unidos, e outros países que também começaram a estudar o tema. Neste período as pesquisas estavam sendo realizadas no Low Temperature Research Station em Cambridge e no Wantage Research Laboratory do Atomic Energy Research Establishment.

Concomitantemente, programas de âmbito nacional sobre a irradiação de alimentos estavam em andamento na Bélgica, Canadá, França e Holanda. O primeiro relato do uso comercial da irradiação de alimentos data de 1957. Na antiga República Federal da Alemanha, o processo foi utilizado durante dois anos para melhorar a qualidade higiênica de especiarias, com o emprego de um gerador de elétrons Van der Graaf. No entanto, uma nova legislação proibiu o tratamento de alimentos por esta tecnologia. Em 1960, no Canadá, a irradiação de batatas foi permitida para impedir a germinação. Utilizava-se uma fonte de ^{60}Co , desenhada para processar aproximadamente 15.000 toneladas/mês. A fábrica funcionou durante uma safra, fechando por motivos econômicos em seguida (MASEFELD e DIETZ, 1983).

Em 1966, do esforço e dedicação de um grupo de professores da Escola Superior Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, surge o CENA – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, uma instituição pioneira na América Latina. Ainda em 1966, realizou-se em Karlsruhe, Alemanha, o Primeiro Simpósio Internacional sobre Irradiação de Alimentos, organizado pela International Atomic Energy Agency (AIEA), no qual representantes de 28 países revisaram as pesquisas realizadas. Porém, mesmo nos países com pesquisas mais avançadas, as autoridades responsáveis pela saúde pública ainda hesitavam na liberação da comercialização dos alimentos irradiados. Nessa época, apesar de Canadá, Estados Unidos e a antiga União Soviética terem liberado cinco produtos alimentícios tratados com radiação, nenhum deles era comercializado (GOLDBLITH, 1966).

No Brasil, a irradiação de alimentos começa a se intensificar durante a década de 70. Em 1974, o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares instala no Centro de Tecnologia das Radiações um acelerador de elétrons de 1,5 MeV para aplicações industriais. E em 1975 cria-se um convênio com a Universidade de São Paulo, para implantação de cursos de pós-graduação no instituto. Com o passar dos anos, o CENA cresce e desenvolve divisões científicas voltadas a irradiação de

alimentos e radioentomologia (IPEN, 2004; CENA, 2004). As décadas de 70 e 80 foram dedicadas às pesquisas toxicológicas para comprovar a inocuidade dos alimentos irradiados, uma vez que esse era o aspecto mais questionado. Os projetos foram desenvolvidos em 24 países sob a coordenação de um Comitê formado pela International Atomic Energy Agency (IAEA/Viena), Food Agriculture Organization (FAO/Roma) e Organization for Economic Cooperation (OEC/Paris) e teve como órgão consultivo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Após intensivos estudos, que envolveram, além de testes químicos, experimentos com animais alimentados com diversos produtos irradiados, o Comitê concluiu, em novembro de 1980, “que a exposição de qualquer produto alimentício a doses de até 10 kGy não apresenta perigo toxicológico; portanto, testes toxicológicos com alimentos assim tratados não são mais necessários” (WHO, 1981).

Nos Estados Unidos, esse processo é considerado um aditivo alimentício, o seu uso em qualquer produto só é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) após exaustivos estudos quanto a segurança radiológica, toxicológica e microbiológica, além dos aspectos nutricional e legal (Pauli e Tarantino, 1995). Atualmente, o FDA já considera aprovada a irradiação de condimentos e especiarias secas, de carne suína para controle de *Trichinella trichinae*, de frutas e vegetais para controle de insetos e amadurecimento de frutas e, em aves, para eliminar bactérias, principalmente *Salmonella* (PAULI e TARANTINO, 1995; DERR, 1996).

Desde a aprovação, em 1980, pelo Comitê formado pela FAO/IAEA/OMS, o número de países com regulamentação sobre o emprego desse processo tem aumentado e, dos mais de 40 que já o aprovaram, 30 o utilizam para fins comerciais (IAEA, 2001).

Um impulso foi dado ao emprego da irradiação de alimentos na década de 90, nos Estados Unidos, devido a surtos de doenças transmitidas por alimentos - DTAs,

causados por *Escherichia coli* O157:H7, considerados desastrosos para a indústria de carne. Com a aprovação da irradiação de carnes vermelhas pelo FDA em 1997 e pelo USDA em 1999, o interesse por essa tecnologia aumentou ainda mais (FDA, 1997; USDA, 1999). Já em 1996, foi solicitado junto ao FDA, a regulamentação do uso em ovos e frutos do mar, principalmente ostras (DERR, 1996), mas ainda não aprovada.

No Brasil, a primeira legislação sobre o emprego da radiação ionizante como processo de conservação foi estabelecida através de Decreto-Lei número 72.718, de 29 de agosto de 1973. As portarias número 9, de março de 1985 e número 30, de 25 de setembro de 1989, aprovadas posteriormente pela Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos, foram revogadas pela Resolução RDC número 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001).

Essa legislação é considerada a mais avançada na área, internacionalmente. Tendo como base as conclusões a que chegou o grupo de estudo formado pela FAO/IAEA/WHO (WHO, 2001), a legislação brasileira aprova o uso da radiação em qualquer alimento com qualquer dose, desde que sejam observadas as seguintes condições:

- a- A dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida
- b- A dose mínima absorvida deve ser inferior àquela que comprometa as propriedades funcionais e/ou atributos sensoriais dos alimentos.
- c- A embalagem deve ter condições higiênicas aceitáveis para o processo de irradiação e
- d- O rótulo do produto deve conter os dizeres “Alimento Tratado por Radiação”.

Atualmente no Brasil existem apenas duas companhias responsáveis em irradiar produtos em escala industrial, a EMBRARAD – Empresa Brasileira de Radiações e a CBE – Companhia Brasileira de Esterilização, que utilizam o cobalto-60 como fonte de energia. Localizada em Cotia, a EMBRARAD tem atualmente 50 funcionários e cerca de 400 clientes no País. Desse número, 58% da receita é gerada na irradiação de material médico-cirúrgico, 12% de fitoterápico e ervas e 10% de cosmético. Em 2002 a Embrarad faturou cerca de R\$ 4,8 milhões, o que representa uma receita seis vezes maior se comparada à de 1980, ano de sua inauguração. Já a CBE foi fundada em 1999 e detém tecnologia 100% nacional. Localizada em Jarinu, interior paulista, a empresa tem 40 funcionários e um parque industrial mais moderno (Clipping IPEN, 2005). Em 2004, o Centro de Tecnologia das Radiações – CTR do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, inaugurou o terceiro irradiador comercial em funcionamento no país (figura 7). O equipamento do IPEN com tecnologia 100% nacional, também utiliza como fonte o ^{60}Co , entretanto possui dimensões menores sendo considerado um equipamento multipropósito de caráter semi-industrial (RELA *et al*, 2005).



Figura 7: Irradiador semi-industrial multipropósito do Centro de Tecnologia das Radiações –CTR do IPEN/CNEN em São Paulo.

3.6 – Uso da irradiação de alimentos

Ficou estabelecido, em um dos relatórios do Comitê Conjunto de Peritos da FAO/WHO (Organização Mundial da Saúde) que “... a proliferação de doenças provocadas por alimentos contaminados é talvez o problema de saúde mais difundido no mundo contemporâneo e uma importante causa de produtividade econômica baixa”. Além disso, um grande número de alimentos tais como carne bovina e de peixe, frutos do mar, pernas de rã e especiarias são freqüentemente rejeitados por países importadores, sob alegação de qualidade higiênica deficiente, incluindo contaminação com microorganismos patogênicos. A magnitude da perda econômica, devida a doenças transmitidas por alimentos contaminados com organismos patogênicos e sua rejeição, pode ser grande e muito embaraçosa para o comércio internacional (IAEA, 1986).

Uma das mais recentes soluções para este problema é o tratamento com radiações ionizantes. A exposição dos alimentos à radiação, dependendo do produto e da dose empregada, inibe o brotamento, retarda o amadurecimento e destrói ou reduz para níveis aceitáveis, bactérias, parasitas, fungos, vírus e insetos que deterioram o produto e podem provocar doenças. O processo é rápido e seguro. Se utilizado dentro dos limites permitidos pela legislação não aumenta a temperatura não deixa resíduos tóxicos, não altera significativamente o aspecto, o sabor e as qualidades nutritivas dos alimentos, deixando-os o mais perto possível do seu estado natural. Os custos também são comparáveis aos processos tradicionais de tratamento (URBAIN, 1986; VILLAVICENCIO *et al.*, 2000).

Em doses e condições adequadas da radiação, quase todos os alimentos podem ser irradiados. desde grãos até aqueles com alto teor protéico tais como derivados do leite e carnes, frutas e verduras frescas. Após a irradiação, os alimentos

dispensam maiores cuidados, sendo eficientemente embalados para evitar uma reinfestação (AQUINO, 2003).

O tratamento com radiações ionizantes pode ser usado de forma independente ou combinado às técnicas já existentes, tais como secagem, fermentação, tratamento químico, tratamento pelo calor, conservação a baixas temperaturas ou em atmosferas modificadas (ROSSI & JESUS, 1994.). Uma grande vantagem do processo de irradiação é que ele permite a diminuição do uso de produtos químicos, usados como conservantes e antibióticos, em alimentos. Existem pelo menos 35 mil marcas de pesticidas comercializados sob 15 mil formas diferentes, que levam para a indústria química mais de 20 milhões de dólares/ano. Essas substâncias provocam anualmente 500 mil intoxicações e matam cerca de 15 mil pessoas nos países do terceiro mundo, além de provocar crises alérgicas, destruir a camada de ozônio e possuir, em alguns casos, propriedades cancerígenas (IAEA, 2001).

Baseadas em estudos de especialistas sobre efeitos das radiações ionizantes em alimentos, a Comissão de Especialistas em Irradiação de Alimentos da FAO/IAEA/WHO (IAEA – Agência Internacional de Energia Atômica) definiu os tipos de radiação e energias a serem utilizadas no tratamento de alimentos: raios gama dos radionuclídeos ^{60}Co ou ^{137}Cs com energias médias de 1,25MeV e 0,66MeV, respectivamente; raios-X com energia máxima de 5MeV e feixe de elétrons com energia máxima de 10MeV. Estes valores de energias estão muito abaixo daqueles capazes de induzir radioatividade mensurável em qualquer material, incluindo os alimentos. Para cada tipo de alimento, e de tratamento, é definida uma dose média ou máxima, apropriada de radiação (Villavicencio, 1998). As radiações gama, de grande penetrabilidade, são utilizadas na irradiação de produtos de grande espessura. Os elétrons que possuem pequena penetração (apenas alguns milímetros) são usados para a irradiação superficial de alimentos ou para produtos a granel. de

finas espessuras. Irradiadores com fontes de ^{60}Co são os mais utilizados, atualmente, para o processamento de alimentos (IAEA, 2001).

Cabe observar que a legislação internacional afirma que a irradiação deve ser usada em alimentos de boa qualidade, visando reduzir a deterioração posterior dos produtos e controlar a infestação e a contaminação por microorganismos mas, nem a irradiação, nem outros métodos, podem tornar um alimento deteriorado apto para o consumo (VILLAVICENCIO, 1998).

3.7- Aplicação das irradiações em grãos

Tendo em vista os elevados danos causados aos grãos e produtos armazenados pelos insetos, torna-se necessário por em prática meios de controle, a fim de se evitar os prejuízos. Um dos métodos mais utilizados é a aplicação de produtos químicos, que apresenta vários inconvenientes, entre eles a possibilidade de causar intoxicação ao consumidor por deixar resíduos nos alimentos tratados. Por ser um método livre de resíduos para o controle de pragas, o tratamento com radiação é um substituto viável à fumigação para satisfazer os regulamentos quarentenários de vários países (DUARTE e ARTHUR, 1994).

O principal interesse na irradiação de grãos e derivados é o de controlar a infestação. Insetos ou fragmentos de insetos presentes em alimentos comprometem a qualidade, constituindo um fator de rejeição pelos consumidores. A própria atividade metabólica dos insetos auxilia na formação de substratos adequados à contaminação com microorganismos, o que acarreta mais perdas e redução no valor nutritivo dos alimentos. O termo usado para designar a irradiação de alimentos para controlar insetos é desinfestação por irradiação (BRIGIDE, 2002).

Para que a desinfestação por irradiação possa provocar completa letalidade dos insetos, num período de 24 horas, como é possível através do uso de pesticidas tradicionais, doses de 3 a 5 kGy seriam necessárias. Entretanto, este nível de dose produz alterações na cor, aroma e sabor e provoca modificações nos seus nutrientes. Farinha de milho, por exemplo, quando utilizadas para a fabricação alimentos, devem possuir certas características reológicas mínimas para permitir o adequado desenvolvimento da receita, que dependem muitas vezes de componentes específicos do amido e das proteínas. Altas doses podem afetar essas propriedades funcionais e não devem, portanto, ser usadas em alguns grãos e seus derivados (URBAIN, 1986.). Além da farinha, outras partes isoladas dos grãos, como farelo e gérmen, também tem sido irradiadas para uso comercial (AQUINO, 2003).

O maior problema na desinfestação de *commodities* (como milho ou trigo) é o grande número de espécies de insetos que podem estar presentes. Assim, no tratamento por irradiação, deve-se escolher a dose mais baixa possível, por motivos econômicos e para não alterar a qualidade dos produtos. Ao mesmo tempo a dose deve ser tal que esterilize ou destrua a espécie mais resistente (VILLAVICENCIO, 1998).

Foi estabelecido que, para desinfestar grãos e derivados sem causar efeitos indesejáveis aos alimentos, uma dose de irradiação entre 0,2 a 1,0kGy deve ser utilizada, dependendo da contaminação inicial, composição química e umidade, espécie, sexo e estágio de vida do inseto, temperatura, tipo de radiação e, mesmo, taxa de dose. O emprego dessas doses não necessariamente causa a morte imediata de todos os insetos mas é suficiente para esterilizar os sobreviventes e causar a completa letalidade destes em poucos dias ou semanas (POTENZA, 2004.).

A radiosensibilidade de 30 espécies de insetos que infestam produtos estocados foi testada no Laboratório do Departamento de Agricultura dos Estados

Unidos, Califórnia, usando técnicas e critérios semelhantes de avaliação. Em grãos o uso de baixas doses de irradiação para a desinfestação de insetos pode eliminar o uso de tratamentos químicos, muitos dos quais produzem danos toxicológicos (KILCAST, 1994). O aumento da vida de prateleira, inibindo o brotamento e eliminando os insetos e parasitas, assim como o incremento das propriedades tecnológicas, é uma constante nessa metodologia (AHMED, 1993). Além disso, a irradiação é uma técnica que pode ser usada como tratamento quarentenário, sendo uma alternativa muito mais promissora quando comparada a fumigantes químicos utilizados para desinfestação de insetos (KÄFERSTEIN, 1993). A fumigação com fosfina, usada para a desinfestação de insetos em uma grande variedade de grãos armazenados e que possui ação lenta, é uma das técnicas que podem ser substituídas pelo uso da irradiação (SPALDING, 1977; POTENZA, 2004).

Em combinação com outros processos, como, por exemplo, baixa atividade de água, atmosfera modificada e embalagens; o uso da irradiação pode oferecer produtos mais estáveis em condições tropicais (IAEA TECDOC – 871, 1996). Processos tecnológicos alternativos de conservação destes produtos surgem com o uso de tratamentos combinados da irradiação e outros processos, minimizando os custos e promovendo uma vida de prateleira maior e mais segura dos produtos irradiados. Estando os grãos apropriadamente embalados, após seguir uma boa qualidade de processamento, o tratamento por radiação irá preservar a boa qualidade por estar agindo no processo de esterilização, e desinfestação de insetos, conforme o caso requerido. Numa irradiação, onde não houver uma correta embalagem do produto, haverá uma reincidência de infestação e o processo se tornará inútil (DIEHL, 1995).

3.8 - Perdas na armazenagem de grãos

As perdas de grãos ocasionadas por pragas em armazéns, presença de fragmentos de insetos nos subprodutos alimentares, deterioração da massa de grãos, germinação, contaminação fúngica, presença de micotoxinas, efeitos na saúde humana e animal, dificuldades para exportação de produtos e subprodutos brasileiros devido ao potencial de risco; são alguns dos problemas que a má armazenagem de grãos produz na sociedade brasileira. As perdas quantitativas, médias brasileiras de grãos, estimadas pela FAO e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), são de aproximadamente 10% do total produzido a cada ano (Quadro 1). Isto representa cerca de 9,8 milhões de tonelada por ano (LORINI, 2004).

Quadro 1 - Perdas por pragas em grãos armazenados nos principais commodities brasileiros

Tipo de grão	Produção Anual (t)	Perda Anual (t)	Valor da Perda Anual (R\$)
Milho	41.536.000	4.154.000	465 milhões
Soja	37.216.000	3.722.000	587 milhões
Arroz	10.366.000	1.037.000	216 milhões
Trigo	2.967.000	296.000	44 milhões
Feijão	2.591.000	259.000	109 milhões
Cevada	338.000	33.000	5,8 milhões
Outros	3.103.300	310.000	-
Total*	98.117.000	9.811.000	1.426.8 milhões

*Safrá 2000/2001 – Fonte : Lorini 2004

Além dessas, existem as perdas qualitativas, que são de maior importância, uma vez que comprometem o uso de todo o grão produzido, ou o classificam para outro uso de menor valor agregado. No caso de trigo, os moinhos não aceitam lotes de trigo com insetos, pois isso fatalmente comprometeria a qualidade da farinha, já que esta terá fragmentos de insetos indesejáveis na indústria de panificação e em outros subprodutos de trigo. Essas são as razões principais do porque se deve fazer o “manejo integrado de pragas na unidade armazenadora”, pois isso permite zerar as pragas nos grãos armazenados. Para o sucesso do manejo integrado, exige-se a realização de vários procedimentos como: mudança de comportamento dos armazenadores, conhecimento da unidade armazenadora de grãos, medidas de limpeza e higienização da unidade armazenadora, correta identificação de pragas, conhecimento da resistência de pragas aos inseticidas químicos, potencial de destruição de cada espécie-praga, proteção do grão com inseticidas, tratamento curativo, monitoramento da massa de grãos e gerenciamento da unidade armazenadora (LORINI, 2004).

Dentre todos estes procedimentos voltados ao manejo da estocagem a armazenamento de grãos, existe também a possibilidade de uso da radiação ionizante. Sendo que esta técnica proporciona vantagens quanto ao aspecto financeiro e a questão da contaminação de grãos (AQUINO, 2003).

No aspecto financeiro a utilização da radiação torna-se economicamente viável, tanto no que se refere ao custo da operação quanto à durabilidade de produtos perecíveis, pois aumenta a vida útil de grãos armazenados, dando ao produtor a opção de comercializá-los após o período de pico da safra, conseguindo, assim, preços melhores (ICGFI, 1999; RELA *et al.*, 2005).

Quanto à contaminação de grãos armazenados, causada por produtos químicos utilizados nas lavouras e nas indústrias, seja para o manejo de pragas ou controle biológico de vegetais a irradiação surge como alternativa aos atuais

métodos. A irradiação é isenta de resíduos, não altera as qualidades organolépticas do produto e não afeta sua aparência tornando-se um método seguro (WHO, 1999)

3.9 – Importância econômica da produção de milho

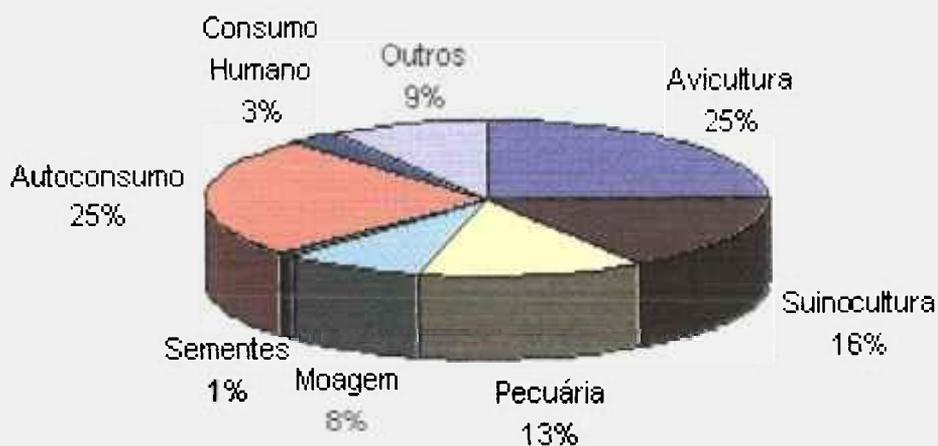
A produção mundial de milho compete com a de trigo pelo título de grão mais produzido no mundo. Esse fato, relativamente recente, deve-se ao forte crescimento da demanda mundial. Nas safras de 92/93 e 93/94 o consumo estava na faixa de 510 milhões de toneladas/ano; já para a safra 96/97, o USDA indicou o consumo de 550 milhões de toneladas, um salto de 7,8% em apenas três anos (Atlas Sócio-Econômico, 2005)

A maior parte desse crescimento de demanda deve-se ao aumento de renda e, portanto, de padrão de consumo (maior consumo de proteínas) dos países asiáticos, em especial dos Tigres e da China. A taxa de crescimento do consumo mundial foi de 2,3% ao ano nos últimos dez anos. Nos Estados Unidos essa taxa foi de 3,1%, enquanto na China o consumo cresceu a uma taxa de 4,5%, puxado principalmente por carnes de frango e suínos, grandes consumidores de milho na sua produção. A demanda mundial só não foi maior nesse período porque a ex-União Soviética está consumindo hoje quase dez vezes menos que a média de consumo da década de 80, passando de 30 milhões de toneladas para pouco menos de 4 milhões em 1995 (PESSOA, 2004).

A produção mundial, apesar de crescente, não está conseguindo acompanhar o ritmo de crescimento do consumo, em parte devido à irregularidade nas últimas safras dos Estados Unidos, maior produtor mundial, respondendo por metade do milho anualmente produzido. Em 2004 a produção mundial de milho chegou à cerca de 705 milhões de toneladas (Atlas Sócio-Econômico, 2005).

A sensível redução nos estoques mundiais promoveu a disparada do preço internacional, com as cotações na Bolsa de Chicago batendo 13 recordes históricos apenas em abril de 1996. Portanto, o cenário de preços para um país como o Brasil, que é grande produtor, mas também importador marginal, requer cuidados extras com a produção (PESSOA, 2004).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, com uma safra correspondente a 5,9% da produção mundial, perdendo o segundo lugar para a China que produz 18,7% deste cultivar.. Entretanto, sua importante indústria de aves e suínos torna o Brasil um dos maiores consumidores de milho do mundo, impedindo inclusive a participação nas exportações mundiais (MB Associados, 2005). O gráfico (figura 8) mostra como está dividido o consumo de milho no Brasil.

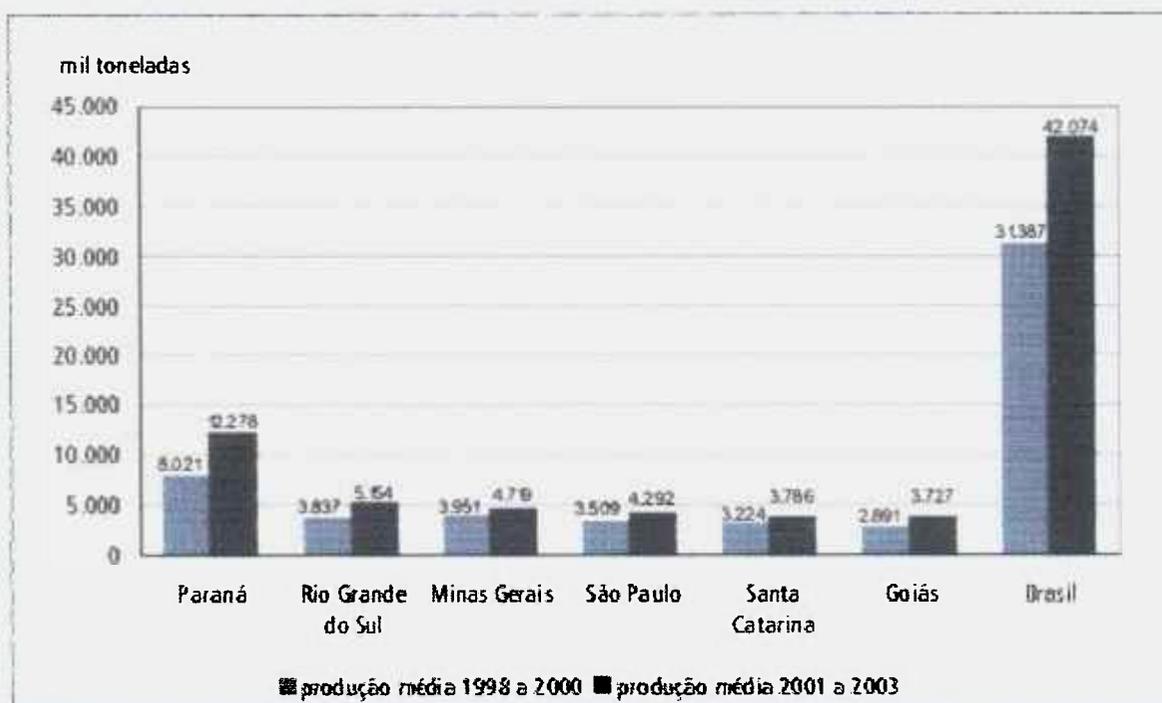


Fonte: MB Associados

Figura 8: Divisão do consumo de milho no Brasil.

Como no caso da soja, a produção brasileira de frangos e suína vem crescendo fortemente nos últimos anos, fazendo com que seja crescente a necessidade de produzir milho. Nos últimos dez anos, o Brasil passou a ser importador de milho, em especial para atender às necessidades da região Nordeste. Os principais fornecedores do Brasil são a Argentina e os Estados Unidos (EMBRAPA, 2005).

Vale ressaltar que a cultura do milho, ao contrário da soja, ainda conta com grandes possibilidades de aumento de produção via crescimento de produtividade. Caracterizada por muitos anos como uma cultura de subsistência, o milho tem uma produtividade muito baixa no Brasil (figura 9) e ainda tem boa parte de seu plantio realizado em pequenas propriedades, com baixo uso de tecnologia, em especial no Sul e no Nordeste (IBGE, 2005).



Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal

Figura 9: Produção média de milho do Brasil e dos principais estados produtores - 1998 a 2000 e 2001 a 2003

A cultura do milho está se transformando em lavoura de ponta, com várias regiões produtoras alcançando produtividade altíssima e com expansão de área em regiões que podem ser intensivamente mecanizáveis, como o Cerrado. O uso crescente de sementes melhoradas continuará sendo um dos grandes impulsos do aumento de produção (EMBRAPA, 2005).

Seguindo os passos da soja, o milho do Centro-oeste vem crescendo de importância no cenário nacional, mas padece dos mesmos males oriundos do custo Brasil. Se a soja do Cerrado perde competitividade na exportação devido aos elevados custos de transporte até os portos, o milho dessa região enfrenta custos proporcionalmente mais elevados para chegar até as grandes indústrias de aves e suínos concentradas na região Sul. Enquanto uma tonelada de soja custa US\$ 250,00 a de milho custa apenas US\$ 100,00 (Atlas Sócio-Econômico, 2005).

A tendência é que os grandes consumidores orientem seus investimentos futuros para as regiões onde há excedente de grãos. A prática de adicionar valor ao produto possibilita menores custos de transporte e maior rentabilidade por tonelada transportada até os grandes centros consumidores. Os melhoramentos em logística tornam-se fundamentais para o êxito de tais investimentos (VIEIRA, 2004).

A eliminação da incidência de ICMS sobre as exportações de grãos e a regulamentação da quebra do monopólio nacional na navegação de cabotagem podem trazer grande impulso à produção de milho, em especial na região Sul. A exportação pode, em médio prazo, se constituir numa nova opção, tendo em vista a expectativa de déficit crescente de produção em nível mundial. As atuais importações nordestinas da Argentina e dos Estados Unidos, que ocorrem em boa medida devido aos elevados custos do transporte marítimo interno, podem ser substituídas por milho do Centro-Sul do País (MB Associados, 2005).

Assume-se, para traçar um cenário para a produção brasileira de milho, que o custo Brasil sofrerá considerável redução nos próximos anos; que os investimentos previstos pelas grandes integrações do Sul com a região Centro-oeste sejam efetivados e que a produtividade seguirá crescendo no período. Com isso pode-se esperar que o milho seja, ao lado da soja, um grande impulsionador do crescimento da produção brasileira de grãos nos próximos anos, com uma colheita de mais de 45 milhões de toneladas ao ano (IBGE, 2005).

4 - Materiais e Métodos:

4.1 - Amostras: As sementes de milho (figura 10) e seus derivados utilizados no experimento, foram adquiridas no comércio local e em diferentes pontos de distribuição. Foram utilizadas trinta amostras diferentes, listadas a seguir:

- 1- Nutriton – Mococa - Lote 005/002, produzido em 15/02/04.
- 2- Bolinho de Chuva – Yoki - Lote 22J4 H, validade 22/04/05.
- 3- Mucilon 5 Cereais – Nestlé – Lote 11T C5B, produzido em 04/08/2004.
- 4- Bolo de Milho – Maizena – Lote 1014 valido até 15/04/05.
- 5- Bolo de Milho – Dr. Oetker – Lote 056, validade agosto de 2005.
- 6- Mistura para bolo (fubá) – Dona Benta – Lote I 31, validade 13/08/05.
- 7- Doritos Queijo Nacho – Elma Chips
- 8- Tortilla Chips Chili – Casa Fiesta – Lote L58223 AI valido até 21/05/2005.
- 9- Mistura para Bolo Sabor Milho – Margaret – Lote 032C de 17/11/04.
- 10- Flocos de Milho – Mãe Terra – Lote fabricado em 13/08/2004.
- 11- Corn Flakes – Kellogg’s – Lote produzido em 00:59 de 09/10/04.
- 12- Corn Flakes – Nestlé – Lote A4 produzido em 02 de dezembro de 2004.
- 13- Farinha de Milho Amarela – Cortesia – Lote 172 valido até 03/04/05.
- 14- Kimilho Flocão - Yoki – Lote 28JO4T, validade 28/07/05.
- 15- Kimilho (pré-cozida) – Yoki – Lote 06 J 04 valido até 06/07/05.
- 16- Milharina (pré-cozida) – Quaker – Lote com validade até julho de 2005.
- 17- Milanesa – Kodilar – Lote 09, validade fevereiro de 2005.
- 18- Meu Instante Galinha com Vegetais – Maagi – Lote Hi08:46JB.
- 19- Express 10 Vegetais – Qualimax – Lote 016 5495 09.
- 20- Viver Bem Galinha e Cereais – Qualimax – L011 811 27 T4.
- 21- Sopa de Milho – Lote 012 642 21 T4.
- 22- Fajita – Lote L58223 AI valido até 21/05/2005.
- 23- Milho Cusco (Peru) – Vermelho

- 24- Milho Cusco (Peru) – Amarelo
- 25- Milho Cusco (Peru) – Cinza
- 26- Milho Nacional à Granel (comercial)
- 27- Pipoca México – La Merced – Lote HC3.
- 28- Pipoca USA – Lote 2162426401.
- 29- Curau Yoki – Lote 01F4 Q, válido até 01/10/05.
- 30- Milho enlatado, em conserva – CompreBem – Lote: L20DT09:13*MI*



Figura 10: Exemplos de algumas amostras de milho utilizadas no experimento.

4.2 – Irradiação das amostras: Foi realizada, em temperatura ambiente (25°C) sob condições aeróbicas, no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) em fonte de ^{60}Co , Gammacell 220 (A.E.C.Ltda) nas doses de 1; 25 e 50 kGy com taxa de dose de 4,15 kGy/h e acelerador de elétrons (Radiation Dynamics Inc. USA, 1.5MeV-25mA), também com doses de 1; 25 e 50 kGy. Tais equipamentos foram calibrados

utilizando-se o sistema dosimétrico de Fricke, sendo o experimento acompanhado por dosímetros Harwell Ambar 3042, utilizados para garantia e controle de dose das amostras.



Figura 11: Amostras devidamente embaladas para irradiação na Gammacell.

Para a irradiação na Gammacell, as amostras foram acondicionadas em microtubos de 2 ml (Eppendorf) e separadas em lotes, de acordo com a dose a ser recebida (figura 11).

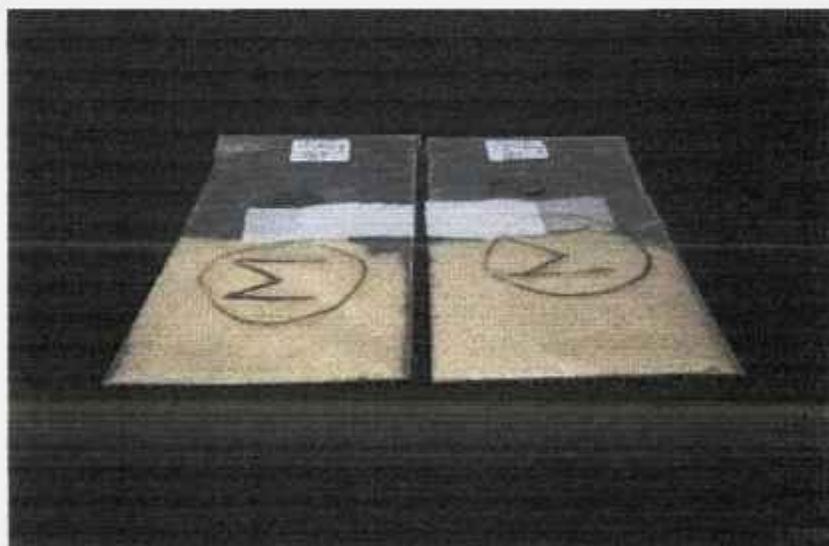


Figura 12: Amostras nas embalagens para irradiação no acelerador de elétrons.

Para a irradiação do material, no acelerador de elétrons, pequenas quantidades de cada amostra, cerca de 20 a 30g foram embaladas em sacos plásticos devidamente lacrados. Este tipo de embalagem mostrou-se adequado para irradiação no acelerador de elétrons, podendo ser manipulado deitado, o que proporcionava uma pequena espessura ao material irradiado (figura 12).

4.3 - Controles positivos: Os controles positivos para Bt11, Bt176 e MON810 foram fornecidos através de uma cooperação internacional do IPEN com o *Centre of Molecular Biology of Federal Research Centre for Nutrition*, de Karlsruhe, na Alemanha. Estes materiais eram constituintes de kits comerciais, existentes na Europa, para a detecção de milhos geneticamente modificados.

4.4 - Adequação das amostras: A metodologia utilizada para a extração do DNA estava adaptada para amostras secas na forma de pó, geralmente farelo ou farinha oriunda de sementes moídas. Para que esta metodologia pudesse ser realizada sem prejuízo em uma maior variedade de alimentos, foram desenvolvidas técnicas de adequação com a finalidade de se obter todas as amostras utilizadas neste experimento na forma de pó. Neste caso foram utilizados um moedor elétrico para triturar os alimentos e uma estufa para a sua secagem. Em alguns casos a adequação das amostras também envolvia um processo de homogeneização, pois na maioria das vezes, a presença de milho na amostra estava concentrada em alguma porção do alimento, o que aumentava as chances de identificação do material geneticamente modificado.

4.5 - Extração do DNA das amostras: Na extração do DNA das amostras, foi utilizada uma técnica “in house” baseada na utilização de três (1, 2 e 3) tampões

de lavagem e extração. Para o preparo de um volume de 50 ml destes tampões foram utilizados os seguintes protocolos:

Tampão 1:

100 mM Tris	0,60 g
20 mM Na ₂ -EDTA	0,37 g
1.4 M NaCl	4,1 g
20 g/l CTAB	1 g
pH 8.0	

Tampão 2:

40 mM NaCl (Mr=58,44 g/mol)	0,11688 g
5 g/l CTAB	0,25 g
pH 8.0	

Tampão 3:

1.2 M NaCl (Mr=58,44 g/mol)	3,509 g
pH 8.0	

Os tampões após seu preparo eram autoclavados e estocados a temperatura ambiente, a fim de serem utilizados no protocolo a seguir:

Para cada extração de DNA, 200 mg da amostra seca na forma de pó, foram transferidas para um tubo (Eppendorf) de 2 ml, contendo 1000µl do tampão 1. Os tubos foram cuidadosamente fechados e agitados no vortex. Após sua homogenização este material foi incubado a 65 °C em sistema de banho-maria com agitação leve. Após trinta minutos de incubação, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000G e 25°C. Com este procedimento as partículas sólidas das amostras depositaram-se no

fundo dos tubos. Com auxílio da pipeta, 500 μL do sobrenadante foram retirados e colocados em novos tubos de 2 ml.

Ao sobrenadante nos novos tubos, foram adicionados 200 μL de clorofórmio hidrofóbico. Estas misturas foram agitadas por trinta segundos e depois centrifugadas por 10 min a 10.000G e 25°C. Deste centrifugado foram transferidos para novos tubos de 2ml a fase superior (água) com um volume equivalente a 300 μL . Aos novos tubos com 300 μL do material foram adicionados 600 μL (equivalente a dois volumes) do tampão número dois. Depois de homogenizados, este material foi incubado por sessenta minutos a uma temperatura de 25°C (temperatura ambiente).

Concluída a incubação, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 10.000G a 25°C o que proporcionou que os tubos fossem virados de uma única vez sobre um recipiente para o descarte do sobrenadante, mantendo-se o DNA acumulado no fundo dos tubos. Após este descarte, os tubos seguiam invertidos (ponta-cabeça) para um processo de secagem em estufa a até 45°C. Secos, os tubos recebiam 350 μL do tampão três e eram levemente agitados para dissolução do DNA. Logo após foram adicionados 350 μL de clorofórmio (figura 13), misturado com cuidado por aproximadamente 30 segundos. Mais uma vez o material era centrifugado por 10 minutos a 10.000G e sua fase superior (aquosa), 250 μL transferida a novos tubos, agora cônicos de 1,5ml.

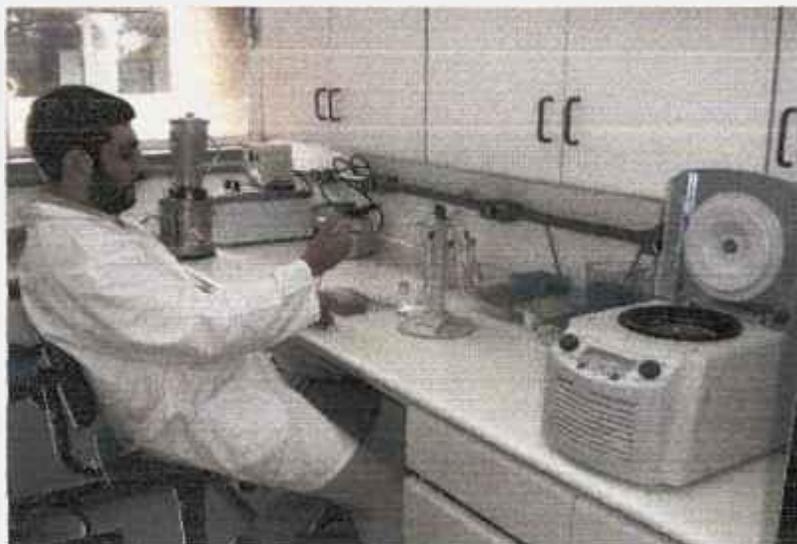


Figura 13: Laboratório destinado ao processo de extração de DNA.

Aos tubos cônicos foram adicionados 150 μ L (0,6 volumes) de isopropanol que foi misturado suavemente por inversão e em seguida centrifugado por 10 minutos a 10.000G a 25°C. Após a centrifugação os tubos eram virados de uma única vez sobre um recipiente para descarte e voltavam ao processo de secagem na estufa a até 45 °C. Depois de secos foram adicionados 500 μ L de etanol a 70%, misturados e novamente centrifugados por 10 minutos a 10.000G a 25°C. Após a centrifugação os tubos passaram por uma última secagem na estufa, na qual saíram prontos para receber 50 μ L de água bidestilada para dissolução do DNA e sua armazenagem em geladeira (4 °C por um curto período) ou freezer (-20 °C para longa duração).

4.6 - Primers: Os primers utilizados nos experimentos foram sintetizados pela Invitrogen do Brasil LTDA., segundo Greiner *et al.* (2004) e estão representados no quadro 2:

Quadro 2: Pimers utilizados, nomes, funções, seqüência e segmento amplificado.

Identificação p/:	PRIMER	Seqüência
Milho (controle) Amplifica:226pb	IVR1-F	5'CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC3'
	IVR1-R	5'GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC3'
Milho Bt11 Amplifica:189pb	IVS2-2	5'CTGGGAGGCCAAGGTATCTAAT3'
	PAT-B	5'GCTGCTGTAGCTGGCCTAATCT3'
Milho Bt176 Amplifica:211pb	Cry03	5'CTCTCGCCGTTTCATGTCCGT3'
	Cry04	5'GGTCAGGCTCAGGCTGATGT3'
Milho MON810 Amplifica:178pb	VW01	5'TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG3'
	VW03	5'TCCATCTTTGGGACCACTGTCCG3'
Milho T25 Amplifica:209pb	T25-F7	5'ATGGTGGATGGCATGATGTTG3'
	T25-R3	5'TGAGCGAAACCCTATAAGAACCC3'

4.7 - A visualização do DNA obtido: Foi realizada através de uma eletroforese em gel de agarose. A agarose foi pesada conforme a concentração desejada para o gel (1,2%). E foi adicionada a um erlenmeyer contendo TBE (0,045M), no volume equivalente ao da cuba a ser utilizada. A agarose foi dissolvida em um forno de microondas. O material foi aquecido até a total dissolução da agarose. Sendo que o forno era mantido ligado até o início da fervura. Daí por diante era ligado por períodos curtos, a fim de evitar a fervura e borbulhamento. A solução era esfriada até cerca de 55°C, para a adição o corante brometo de etídio na concentração final de 0,5g/ml no gel e também no tampão quando necessário.

4.8 - A reação em cadeia pela polimerase (PCR): Foi realizada em um volume total de 25µL (24µL de mastermix + 1µL da amostra). Juntamente com a PCR das amostras foi realizado um controle de contaminação (controle negativo (CN) da PCR com água em lugar da solução de DNA). O mastermix era sempre preparado em

banho de gelo, seguindo o seguinte protocolo:

Mastermix – Buffer sem cloreto de magnésio:

Solução de DNA	1,0 µl
ddH ₂ O	15.9 µl
10xPCR-buffer (tampão).....	2.5 µl
Primer 1 (5 µM).....	1.0 µl
Primer 2 (5 µM).....	1.0 µl
dNTP(2.5 mM).....	2.0 µl
polimerase termoestável (5 U/µl).....	0.1 µl
Cloreto de magnésio.....	1.5 µl

Antes da colocação dos tubos contendo amostras e mastermix no termociclador, este material era centrifugado a 5°C, durante cinco segundos (tecla pulsar). Para a PCR foi utilizado um termociclador modelo Mastercycler Eppendorf (figura 14) programado de acordo com os primers utilizados no mastermix.

4.9 - Programação do termociclador: Neste experimento, independente do tipo de primer utilizado na PCR, a programação do termociclador manteve-se sempre a mesma. Dez minutos a 95°C para desnaturação inicial; quarenta ciclos de um minuto e meio cada, sendo trinta segundos a 95°C para desnaturação, trinta segundos a 64°C para anelamento e trinta segundos a 72°C para extensão. Ao final dos ciclos a temperatura de 72°C era mantida por sete minutos para finalizar a PCR.



Figura 14: Termocilcador utilizado, modelo Mastercycler (Eppendorf).

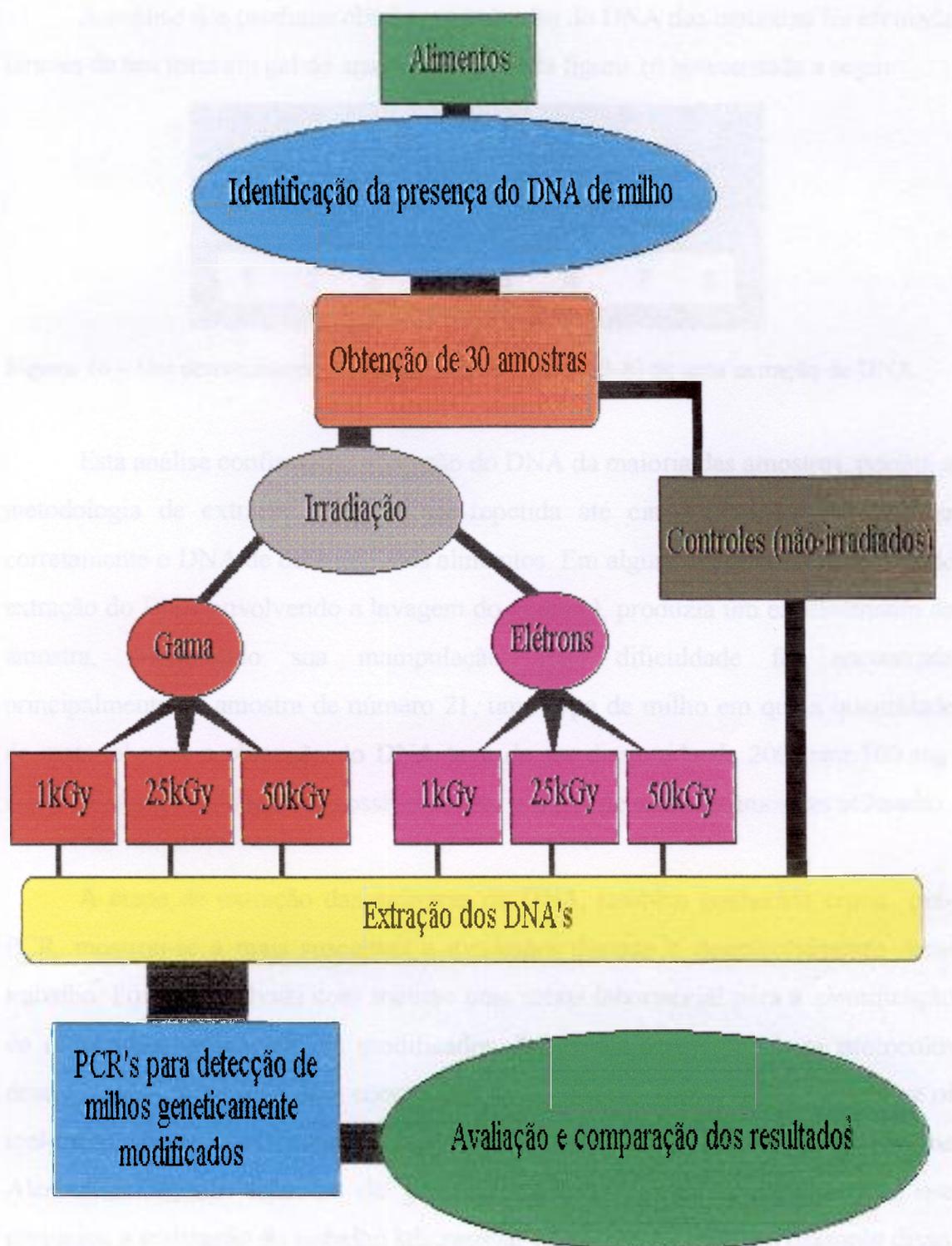
4.10 - A eletroforese dos produtos da PCR: A eletroforese dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose, o que permite a separação de moléculas de DNA em função de seu tamanho. Dependendo da faixa de separação requerida, utilizam-se diferentes concentrações de agarose, todos os géis utilizados neste experimento foram realizados numa concentração de agarose de 2%. Para manter o pH inalterado ao longo da corrida eletroforética e garantir a formação de um campo elétrico, era utilizada uma solução de TBE (Tris/Borato/EDTA), equivalente ao TAE (Tris/Acetato/EDTA), em pH alcalino. Essas soluções foram preparadas em concentrações de 0,45M para estoque, sendo diluídas para 0,045M no momento do uso. A tensão constante (medida em Volts) empregada para a corrida da eletroforese em gel de agarose é um valor que variava em função do comprimento do gel e a distância entre os eletrodos da cuba. De modo geral os fabricantes da cuba sugerem os valores ideais, que variavam na faixa de 50 a 150 V, dependendo do tamanho da cuba (8-10 V por cm). Após a eletroforese, os géis obtidos foram levados a um foto-

documentador digital, Vilber Lourmat Imager System (figura 15), para o devido registro dos resultados.



Figura 15: Trabalho de foto-documentação para o registro dos resultados.

5- Delineamento Experimental:



6- Resultados :

A análise dos produtos obtidos na extração do DNA das amostras foi efetuada através de seu teste em gel de agarose, como o da figura 16 apresentada a seguir:



Figura 16 – Gel determinando insucesso (1,2) e sucesso (3-8) de uma extração de DNA.

Esta análise confirmou a obtenção do DNA da maioria das amostras, porém, a metodologia de extração teve de ser repetida até cinco vezes, para se obter corretamente o DNA de determinados alimentos. Em alguns casos, a metodologia de extração do DNA envolvendo a lavagem do material, produzia um espessamento da amostra, dificultando sua manipulação. Esta dificuldade foi encontrada principalmente na amostra de número 21, uma sopa de milho em que a quantidade de material para a obtenção do DNA teve de ser diminuída de 200 para 100 mg. Apesar desta dificuldade, foi possível extrair o DNA de todas as amostras utilizadas.

A etapa de extração das amostras de DNA, também conhecida como pré-PCR, mostrou-se a mais suscetível a evoluções durante o desenvolvimento deste trabalho. Foi desenvolvida com sucesso uma rotina laboratorial para a identificação de organismos geneticamente modificados. Tal rotina teve como base protocolos desenvolvidos através de uma cooperação internacional entre o IPEN e o Centre of molecular Biology of Federal Research Centre for Nutrition, de Karlsruhe, na Alemanha. Alguns aspectos do protocolo original foram melhorados, o que propiciou a realização do trabalho laboratorial em menos tempo. Um exemplo disso, foi o uso de uma estufa para a secagem dos tubos a 45°C durante a extração de

DNA, procedimento anteriormente realizado sob a bancada em temperatura ambiente e o uso de um forno de hibridação no lugar do tradicional banho-maria também foi usado, garantindo precisão nos processos de incubação.

Os resultados deste trabalho mostraram que a técnica utilizada apesar de mais trabalhosa, possui vantagens em relação ao uso de kits comerciais. Além de ser mais barata, alguns dos seus procedimentos podem ser ajustados de acordo com o tipo de amostra a ser utilizada. Por exemplo, em alguns alimentos que contem muita gordura, algumas etapas do procedimento de extração podem ser repetidos e fim de se obter uma melhor separação do DNA.

A adequação das amostras para esta metodologia também foi melhorada neste experimento. Algumas amostras como a de número 30 (milho enlatado) não encontrava-se pronta para o protocolo original, que previa amostras de alimentos na forma de pó. Neste caso, foi desenvolvida uma técnica para a obtenção de um farelo através da secagem das amostras utilizando-se uma estufa a 45°C. Em alguns casos, esta adequação envolveu também uma triagem da parte do produto que continha o DNA desejado. No caso de sementes, isso foi feito separando-se o cotilédone, da parte embrionária (germe) que contem maiores concentrações de DNA.

Uma possível falha verificada na técnica estudada para a identificação de grãos geneticamente modificados que foram tratados por irradiação está relacionada ao armazenamento do DNA destas amostras. Em alguns casos foi possível observar que o DNA, de amostras irradiadas sabidamente positivas, após nove meses de estocagem em freezer a -18°C, resultaram em “falsos negativos” utilizando-se a amplificação pela técnica da PCR. Este efeito foi observado, apenas em um pequeno número de amostras, como por exemplo nas de número 10, 21, 22 e 26, todas irradiadas em doses de 25 ou 50 kGy. O resultado desta observação leva a crer que a irradiação provocou a uma degradação do DNA armazenado (figura 17).

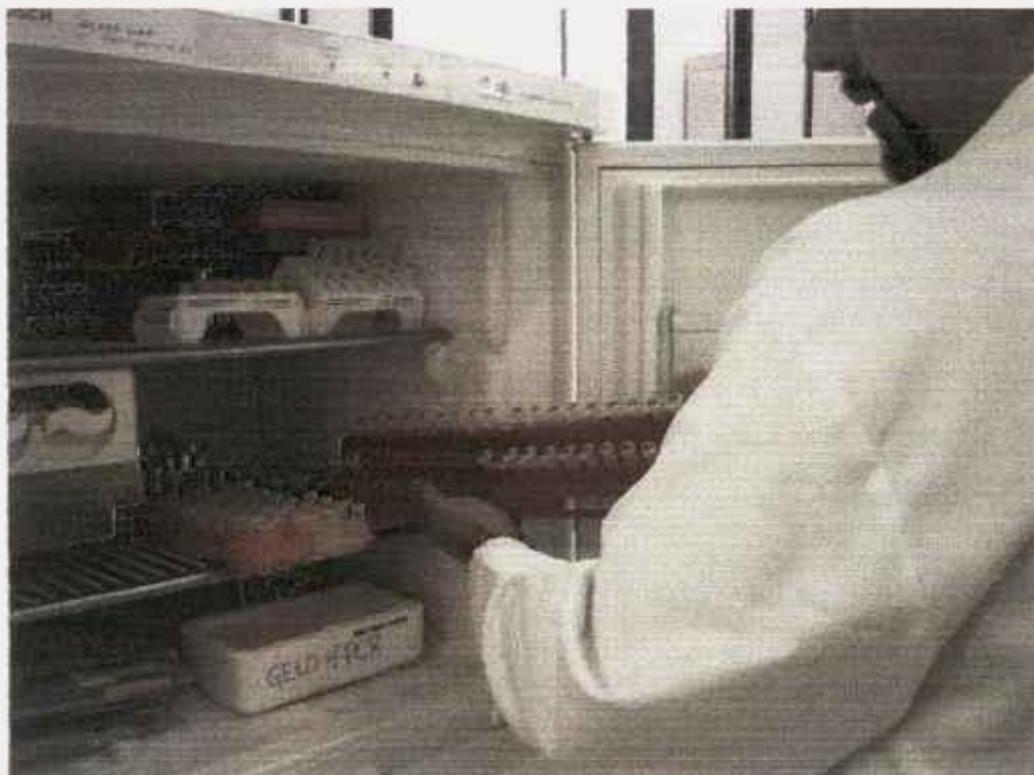


Figura 17: Armazenagem das amostras de DNA.

A reação da PCR propriamente dita (mastermix) não sofreu nenhuma modificação durante a execução do trabalho. Entretanto etapas do pós-PCR também foram modificadas, visando melhorias no trabalho laboratorial. A mais significativa destas mudanças está relacionada à montagem dos géis de agarose para eletroforese. Inicialmente o protocolo previa adição no gel de brometo de etídio na concentração final de 0,5g/ml. Com a evolução do trabalho a adição de brometo de etídio na confecção do gel foi suprida por uma técnica de coloração do gel, após a eletroforese.

As primeiras PCR's deste trabalho foram realizadas para a identificar a presença de milho nas amostras, pois para a realização do experimento foi necessária a identificação de pelo menos trinta amostras (listadas no item amostras)

com resultados comprovados para a presença do DNA de milho. Durante esta seleção, alguns alimentos mesmo possuindo milho em sua composição, não tiveram o DNA do milho identificado através da PCR. Um destes alimentos foi uma marca de amido de milho, que por algum processo industrial acabou provavelmente tendo seu gene IVR1 totalmente destruído. Outro alimento, um pó para o preparo de missoshiro (sopa japonesa) também não pode ter a confirmação da presença do ingrediente milho através da PCR. Estes produtos foram excluídos do trabalho, não constando da lista de amostras utilizadas.

Após a irradiação nas doses de 1, 25 e 50 kGy com cobalto 60 das trinta amostras comprovadamente possuidoras de milho, foram realizadas novas PCR's utilizando-se os primers IVR1. O resultado desta avaliação mostrou que mesmo a altas doses de irradiação, a seqüência alvo para os primers IVR1 mantinham-se intactas, preservando a detecção dos alimentos possuidores de milho como ingrediente (figura 18, 19 e 20).

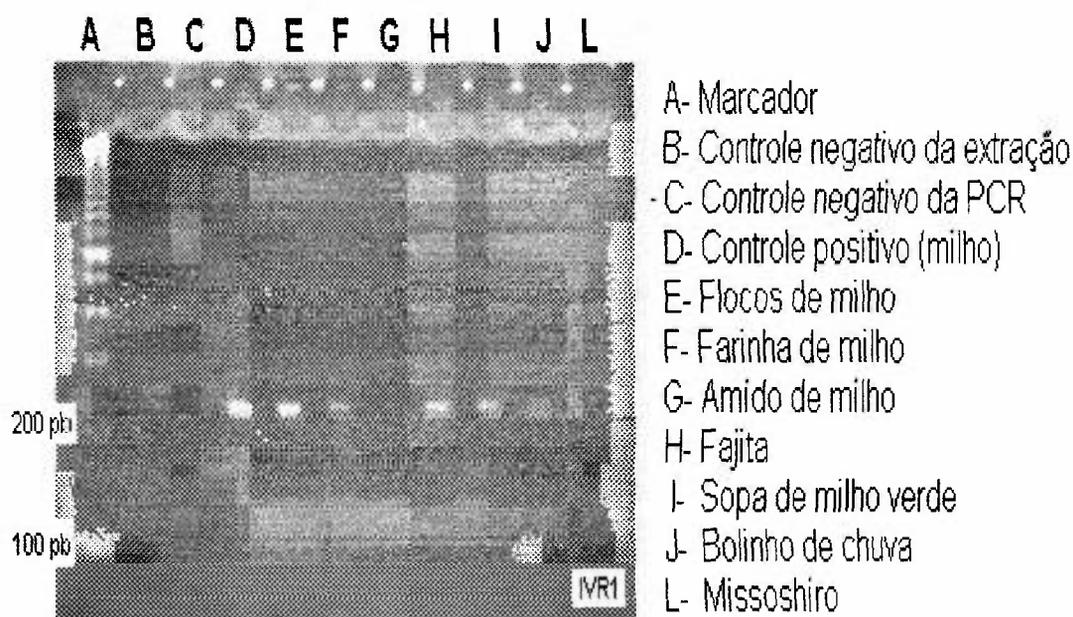


Figura 18 – PCR com primer IVR1, mostrando a presença ou ausência de milho.

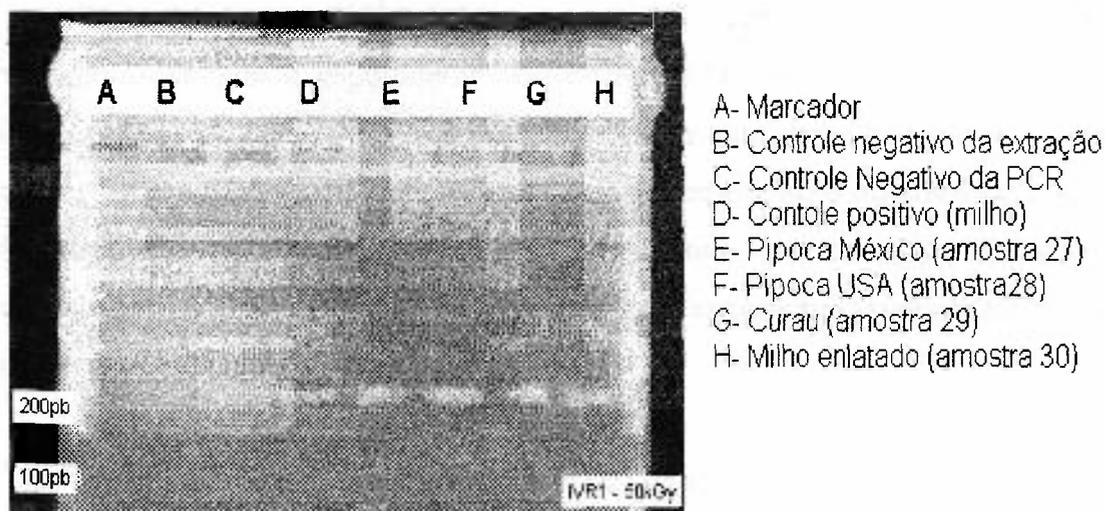


Figura 19 – Amplificação através do primer IVR1, mesmo com doses de 50kGy.

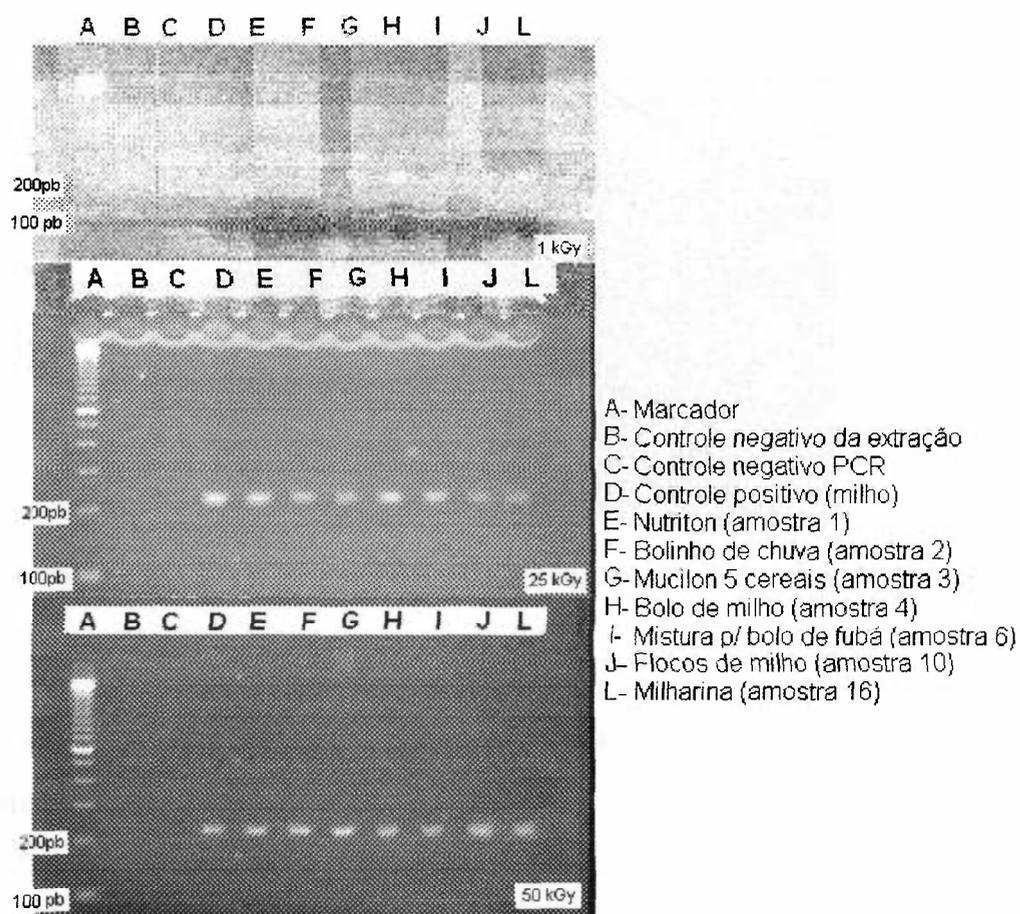


Figura 20 – PCR com primer IVR1, utilizando-se amostras irradiadas em diferentes doses.

Todas as trinta amostras foram testadas para os diferentes “primers” providenciados para o experimento. Entretanto os resultados relacionados com a identificação dos milhos Bt176 e T25, não foram considerados. Os testes para a identificação do milho Bt176 resultaram da não amplificação do DNA do controle positivo existente. Mesmo sem a presença de um controle positivo adequado, foram realizadas PCR's com as amostras utilizadas no experimento, apresentando-se em todos os casos resultados negativos (figura 21).

Quanto ao T25, não foi conseguido um controle positivo para esta amostra. Mas da mesma forma que o Bt176, foram realizadas PCR's com as amostras utilizadas no experimento. Entretanto todos os resultados apresentaram-se negativos.

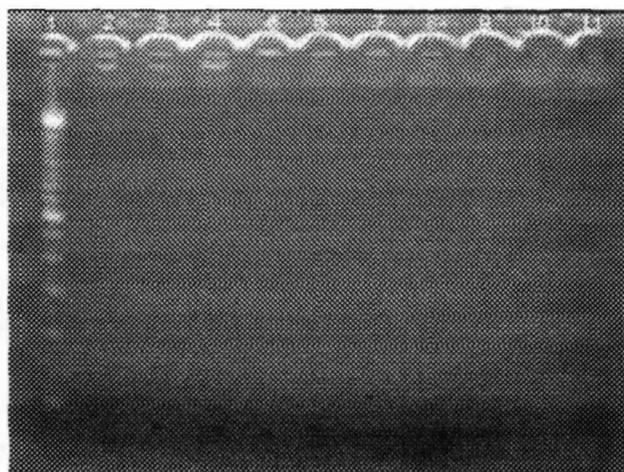


Figura 21 – Resultado de uma PCR para Bt176, não amplificação do controle positivo.

Os testes para a identificação dos milhos BT11 e MON810 foram realizados com todas as amostras antes de serem irradiadas. Os resultados destas PCR's mostraram que poucas eram as amostras que possuíam algum ingrediente geneticamente modificado. Mostraram-se positivas para BT11 as amostras 1, 3, 21 e 22 e para MON810 as amostras 5, 13 e 22 (figuras 22, 23 e 24).



Figura 22 – Identificação de amostras possuidoras de milho Bt11.

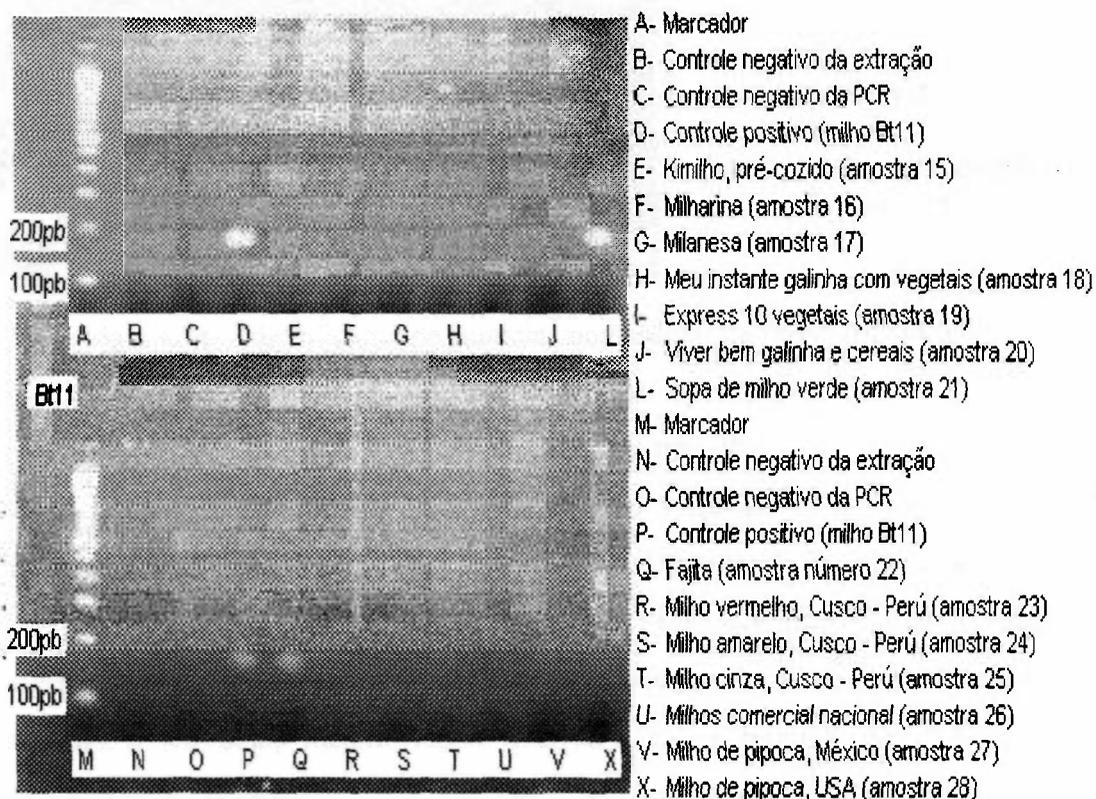


Figura 23 – Identificação de amostras possuidoras de milho Bt11.

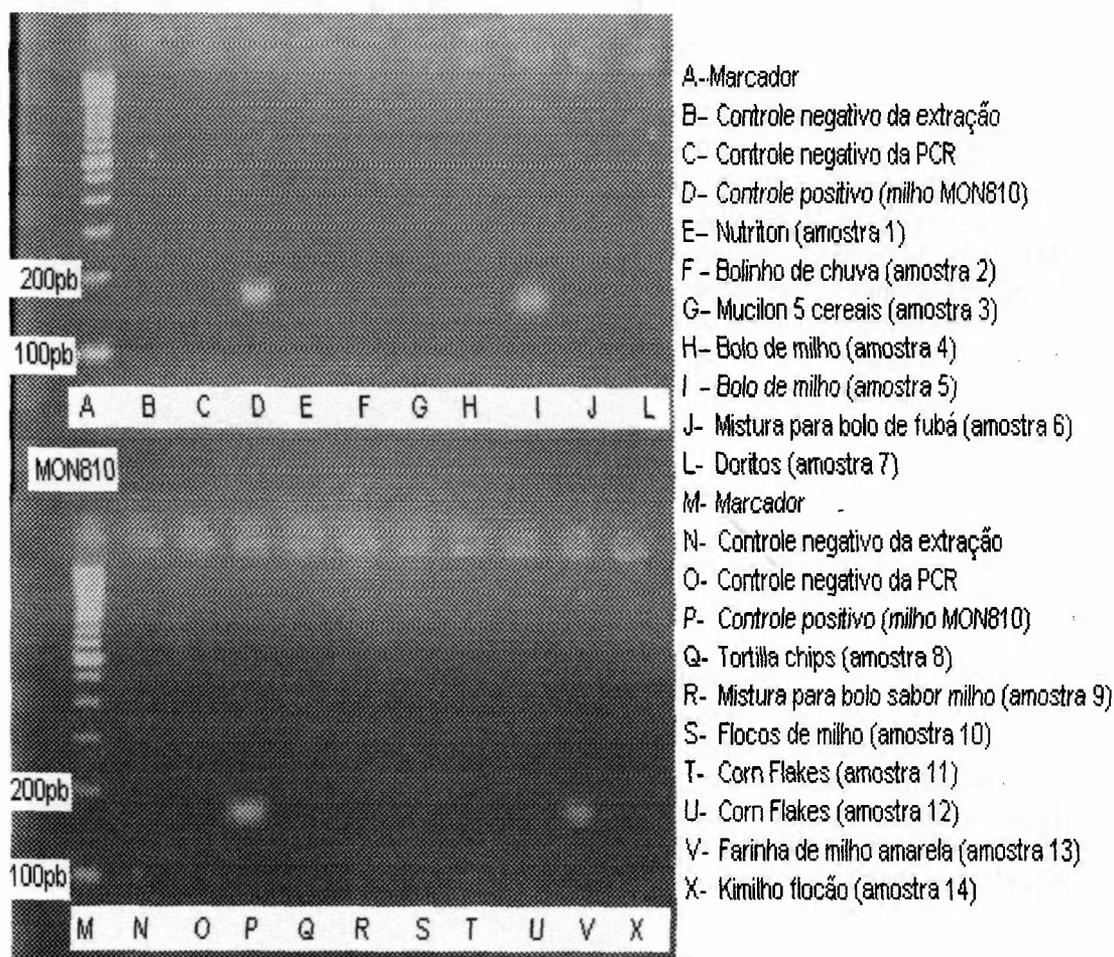


Figura 24 – Identificação de amostras possuidoras de milho MON810.

De acordo com estes resultados, o trabalho de detecção de milhos geneticamente modificados focou o estudo das amostras 1, 3, 5, 13, 21 e 22. Tais amostras foram então analisadas através da técnica da PCR após serem irradiadas nas doses de 1, 25 e 50 kGy em fonte de ^{60}Co , Gammacell 220 (A.E.C.Ltda), originando resultados idênticos as amostras que não receberam tratamento por radiação. Ou seja, mesmo após a irradiação, a técnica da PCR continuava apresentando resultados positivos para a identificação de transgênicos nestas amostras (figuras 25 e 26).

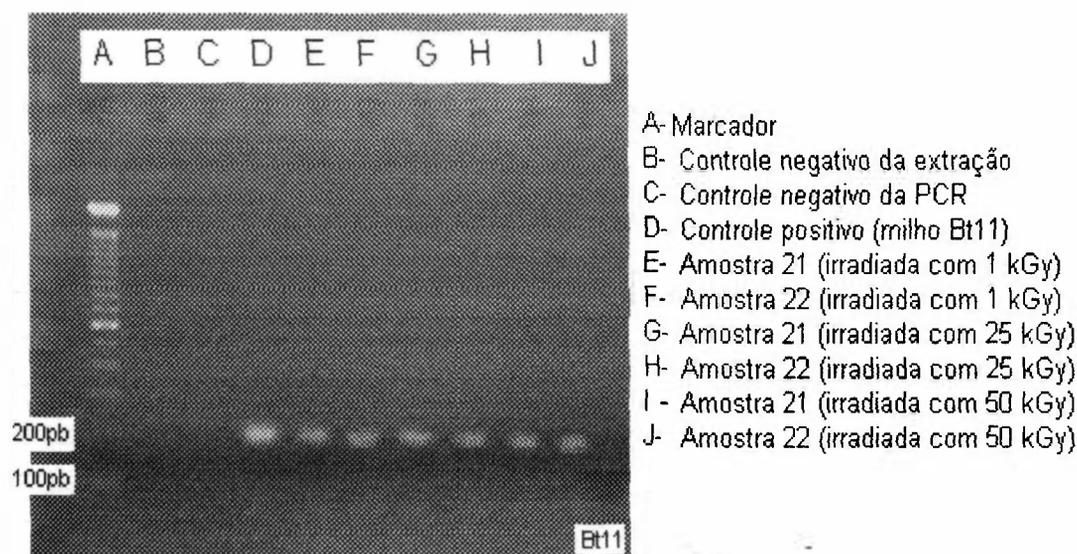


Figura 25 – Resultado da PCR de amostras contendo milho Bt11 depois de irradiadas.

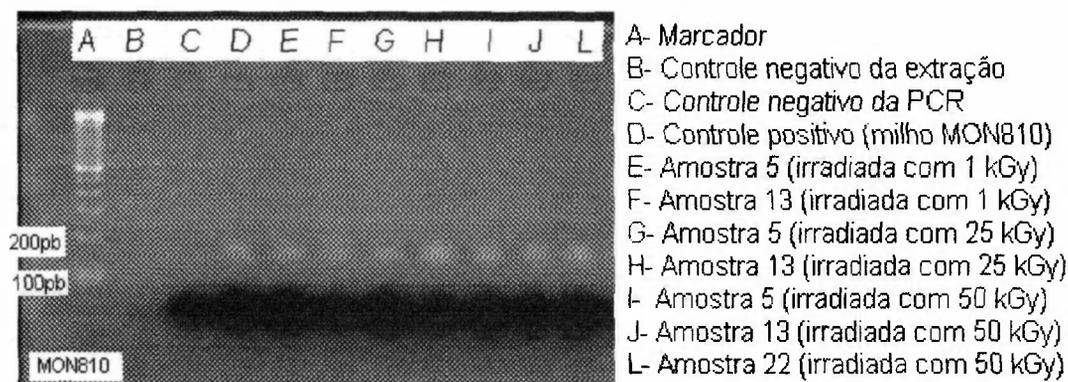


Figura 26– Resultado da PCR d amostras contendo milho MON810 depois de irradiadas.

Os resultados das amostras irradiadas em Gammacell mostraram-se iguais a aqueles obtidos pela PCR das amostras 1, 3, 5, 13, 21 e 22 após serem irradiadas nas doses de 1, 25 e 50 kGy pelo acelerador de eletrons (Radiation Dynamics Inc. USA, 1.5MeV-25mA). Como resultado final do experimento, o quadro 3 foi montado com a relação de todas as PCR's realizadas durante o estudo, seus resultados positivo (+) ou negativo (-) para cada um dos tipos pesquisados e sua equivalência (ok) após a irradiação do material. Não existem diferenças na detecção de milhos geneticamente modificados Bt11 e MON810 em produtos alimentícios tratados por irradiação.

Quadro 3: Resultado final das PCR's e sua equivalência com as amostras irradiadas.

Alimentos	IVR1	Bt11	MON810	IRRADIAÇÕES					
				1kGy gama	25kGy gama	50kGy gama	1kGy elétrons	25kGy elétrons	50kGy elétrons
Amostra 1	+	+	-	ok	ok	Ok	ok	ok	ok
Amostra 2	+	-	-						
Amostra 3	+	+	-	ok	ok	Ok	ok	ok	ok
Amostra 4	+	-	-						
Amostra 5	+	-	+	ok	ok	Ok	ok	ok	ok
Amostra 6	+	-	-						
Amostra 7	+	-	-						
Amostra 8	+	-	-						
Amostra 9	+	-	-						
Amostra10	+	-	-						
Amostra11	+	-	-						
Amostra12	+	-	-						
Amostra13	+	-	+	ok	ok	Ok	ok	ok	ok
Amostra14	+	-	-						
Amostra15	+	-	-						
Amostra16	+	-	-						
Amostra17	+	-	-						
Amostra18	+	-	-						
Amostra19	+	-	-						
Amostra20	+	-	-						
Amostra21	+	+	-	ok	ok	Ok	ok	ok	ok
Amostra22	+	+	+	ok	ok	Ok	ok	ok	ok
Amostra23	+	-	-						
Amostra24	+	-	-						
Amostra25	+	-	-						
Amostra26	+	-	-						
Amostra27	+	-	-						
Amostra28	+	-	-						
Amostra29	+	-	-						
Amostra30	+	-	-						

7- Discussão:

As expectativas quanto aos resultados deste experimento, estavam diretamente relacionadas a possível quebra do “DNA exógeno” (transgenicidade) dos milhos estudados perante o tratamento por radiação ionizante. Ou seja, a irradiação poderia afetar o resultados da PCR, quebrando moléculas de DNA e mascarando a presença do milho geneticamente modificado. Neste caso, o processamento de alimentos por radiação ionizante poderia ser utilizado comercialmente a fim de destruir moléculas de DNA transgênico fazendo com que alimentos possuidores de organismos geneticamente modificados fossem confundidos com alimentos convencionais. Em certos casos, tal técnica poderia ser utilizada somente para diminuir a quantidade aparente de organismos geneticamente modificados em uma amostra, adequando o produto final às normas de rotulagem.

Entretanto, os resultados observados mostraram que a quebra da “transgenicidade” não pode ser obtida, mesmo utilizando-se doses bastante elevadas de radiação. O uso de altas doses, referentes a irradiação de grãos em até 50 kGy foram aplicadas neste trabalho apenas como forma de estudar a interação desta tecnologia com a técnica da PCR, não sendo este procedimento um protocolo comercialmente viável para grãos.

Os efeitos da quebra do DNA em alimentos processados por radiação são mostrados por diversos autores como Villavicencio (2000) e Delincée (2002). O DNA tem uma propriedade particular diferenciada de todos os outros constituintes da célula, que o transforma em um excelente alvo. É uma molécula enorme, em comparação com as demais moléculas celulares e sua função depende diretamente de sua estrutura, podendo assim, ser facilmente danificado pela radiação. Estima-se que uma dose de 0,1 kGy, danificaria 2,8% do DNA de uma célula bacteriana

enquanto que a mesma dose danificaria 0,14% das enzimas e somente 0,0005% dos amino ácidos deste mesmo organismo.

Pollard (1966), considera que a sensibilidade à radiação de macromoléculas é aproximadamente proporcional ao seu peso molecular. Neste caso poderíamos dizer que a probabilidade de se destruir os fragmentos característicos de cada um dos cultivares geneticamente modificados de milho é realmente muito pequena. Cada um destes alvos amplificados pela técnica da PCR possui em média 200 pares de base e podem aparecer em grande quantidade dependendo do tipo da amostra utilizada. Segundo James *et al.* (2003), a técnica da PCR é a mais adequada para a detecção de organismos geneticamente modificados pelo fato de ser altamente sensível. A presença de um único fragmento do DNA transgênico na amostra pode ser amplificada varias vezes pela PCR, indicando assim a sua presença.

Quanto a detecção de milhos geneticamente modificados, os resultados encontrados neste trabalho são compatíveis com outros experimentos relacionados à identificação destes cultivares em nosso país. Greiner *et al.* (2004), constatou a presença de variedades geneticamente modificadas em alimentos fabricados no Brasil. Três das amostras utilizadas neste trabalho, as de número 13, 21 e 22, também foram utilizadas e identificadas pelo pesquisador alemão. A amostra de número 21, uma sopa de milho, também foi identificada como possuidora de milho geneticamente modificado através de uma pesquisa realizada pelo IDEC – Instituto de Defesa do Consumidor e veiculada na mídia pela Folha de S.Paulo – 21/06/2000.

As técnicas utilizadas nesta pesquisa passaram por um processo evolutivo, proporcionando sua utilização na rotina laboratorial, ou seja, em um trabalho laboratorial em larga escala. Porém algumas modificações cogitadas no início das atividades laboratoriais não foram implementadas. Por exemplo, no início cogitou-se a criação de uma PCR-multiplex para a identificação dos milhos geneticamente

modificados. Trabalhos como o de James *et al.* (2003), relatam o uso da PCR-multiplex, sendo possível através de uma única seqüência de reações de amplificação, detectar múltiplas sequências alvo em uma mesma amostra.

Entretanto, o desenvolvimento deste protocolo mostrou-se pouco interessante, pois apenas uma das amostras estudadas, a de número 22, continha duas variedades de milho geneticamente modificados. Além disso, o tamanho das seqüências alvo para estas duas variedades de OGM's, o milho Bt11 e o MON810, era muito parecido, com uma diferença de apenas 10 pares de base, o que poderia confundir a leitura resultante do gel de agarose a 2%. O desenvolvimento de uma PCR-multiplex, poderia ser desenvolvida portanto, unindo-se a detecção do DNA de milho através do primer IVR1, com uma variedade de milho geneticamente modificado, Bt11 ou MON810. Isso pelo fato de que a seqüência alvo do primer IVR1 é bem maior que a dos milhos Bt11 e MON810, contendo cerca de 226 pares de base. Ainda segundo James *et al.*, 2003, a criação de uma PCR-multiplex para milhos Bt11 e MON810 é possível, aumentando-se a concentração de agarose, o que poderia ser realizado em nosso caso montando-se um gel a 3%.

Durante a realização deste trabalho, outros protocolos, oriundos de kits comerciais, foram utilizados no mesmo laboratório. Uma avaliação entre estas técnicas mostrou que o protocolo utilizado neste trabalho possui grandes vantagens quando utilizado por laboratórios que fazem a detecção de organismos geneticamente modificados como rotina. Apesar de ser mais trabalhoso o protocolo utilizado neste experimento possui um preço bem mais acessível, que os kits comerciais utilizados para este fim. Outra vantagem da utilização deste protocolo "in house" está na possível utilização dos reagentes usados neste experimento em protocolos voltados a outras pesquisas, fato que não acontece em alguns kits comerciais, que vinculam os reagentes do processo de extração de DNA a um kit específico para a reação da PCR.

Entre as diversas amostras utilizadas, a única modificação observada em relação ao resultado da detecção pela PCR de milhos geneticamente modificados foi o tempo de duração das amostras de DNA mantidas refrigeradas. Os protocolos atualmente utilizados, descritos em Crede *et al.* (2005), prevêem o estoque de DNA. Após a realização da extração do DNA das amostras, este material é mantido estocado a uma temperatura de -18°C (freezer). No presente trabalho, após nove meses de estocagem algumas destas amostras foram utilizadas para a realização de um artigo científico, chamando a atenção por não apresentarem mais os resultados positivos obtidos.

Tais amostras haviam sido irradiadas com altas doses, e foram testadas também com o primer IVR1, gerando resultados negativos para a amplificação das seqüências alvo. Entretanto mais da metade do material estocado, irradiado a altas doses, ainda apresentava a presença das seqüências alvo referentes a PCR. Por este motivo não é possível afirmar qual a relação entre a irradiação das amostras e a diminuição do tempo de estocagem dos DNAs provenientes de extração. Não foi encontrado na literatura informações referentes a estocagem de DNA proveniente de material irradiado e este fato foi observado uma única vez durante o experimento, carecendo assim de maiores estudos.

Sabe-se que algumas alterações provocadas pela irradiação favorecem o aparecimento de radicais livres. Muñoz (1985) relaciona o aparecimento destes radicais livres a possível danificação da molécula de DNA. O aumento do número de radicais livres nestas amostras, que receberam maiores doses de irradiação, poderiam estar afetando o DNA armazenado, diminuindo assim a sua validade, mesmo depois de estocado a baixas temperaturas.

Outra ocorrência que chamou a atenção durante o experimento foi a triagem dos alimentos a serem utilizados nesta pesquisa. O teste inicial para identificação da presença de DNA de milho nas amostras mostrou-se negativo para alguns alimentos que segundo o rótulo possuíam milho como ingrediente. Alimentos oriundos de milho como amido de milho, apresentaram resultados negativos para a presença de DNA de milho, não podendo assim entrar para a lista das trinta amostras de alimentos avaliados. Pietsch e Waiblinger (2001) já mostraram que nestes casos, torna-se importante o uso de outras técnicas laboratoriais, que poderiam identificar a existência de ingredientes geneticamente modificados, independentemente da presença do DNA.

Segundo Stave, (1999), a identificação de organismos geneticamente modificados através da existência de proteínas nos alimentos ainda se faz importante, justamente por este motivo. Muitas vezes a identificação da existência de organismos geneticamente modificados em alimentos industrializados, através da extração e amplificação do DNA pode ser prejudicada pelo tipo de processamento do alimento. Sabemos que altas temperaturas degradam a molécula de DNA, o que poderia afetar a pesquisa pela PCR. Ainda segundo Stave (1999), é o produto da síntese, as proteínas específicas, que podem ser responsáveis por mudanças nas características do alimento e possíveis modificações no produto que chega ao consumidor.

Apenas dois alimentos cujo rótulo indicavam milho como ingrediente, não foram utilizados na detecção pela PCR por falta de DNA. O amido de milho, provavelmente pelo fato de ter passado por um processo de refino bastante eficiente e o missoshiro, provavelmente por além de passar por um processo industrial rigoroso, possuir uma baixíssima quantidade de milho na amostra. Mesmo assim foi possível mostrar neste experimento que a técnica da PCR é bastante sensível.

Testes com alimentos cozidos a alta temperatura e pressão, como o cereal matinal Corn Flakes, e o milho enlatado (cozido) mostraram que a técnica da PCR é sensível o bastante para identificar a existência de milhos geneticamente modificados nestas amostras. Nestes casos em especial, foram desenvolvidos durante o experimento processos para aumentar a quantidade de DNA durante o processo de extração. De grande importância para a técnica da PCR, a correta e eficiente extração do DNA é relatada por Romano (1999) e Dickinson (1995), como um protocolo a parte, designada por muitos autores como pré-PCR.

No caso do milho que se apresenta em conserva, foi desenvolvida uma técnica de secagem e moagem do material, para torná-lo compatível ao protocolo original que prevê as amostras na forma de pó. Tal técnica utiliza-se de uma estufa para a secagem da amostra a temperatura de 45°C, depois de seca a amostra é moída transformando-se em farelo. Estas pequenas modificações a fim de adequar as amostras ao protocolo utilizado são necessárias segundo Gachet 1999, devido a grande diversidade de tipos de amostras a serem analisadas.

Quanto às amostras de Corn Flakes (cereal matinal), durante o processo de moagem do alimento e homogeneização dos flocos, foi possível notar que o farelo resultante do processo continha dois tipos distintos de material. Um pó mais claro e fino formado pelo açúcar constituinte no alimento e outro mais grosseiro amarelado, proveniente do milho. Neste caso foi possível separar este material, utilizando-se para a extração o material amarelado onde teoricamente a concentração de DNA era maior.

Este processo de seleção de partes da amostra para a realização da técnica da PCR foi também utilizada em outros alimentos, o que provavelmente ajudou na obtenção de uma maior concentração de DNA após o processo de extração realizado nas amostras. Alguns alimentos necessitaram de ajustes no protocolo de extração do

DNA. Entre eles a amostra 21, uma sopa de milho transformava-se em uma substância espessa dificultando seu manuseio. Tal característica deve-se a presença de um espessante na amostra, a goma guar. É interessante notar que esta característica apareceu diminuída nos tubos contendo material irradiado da mesma amostra. Nestes tubos é possível afirmar que o uso da irradiação afetou os constituintes do alimento modificando suas características.

Uma importante contribuição do melhoramento da técnica envolvida neste estudo, está relacionada a obtenção dos resultados finais proveniente da coloração dos géis de agarose. Foram implementadas e analisadas durante o experimento duas técnicas de montagem do gel de agarose. Uma com a coloração antes e outra depois da eletroforese, usando brometo de etídio, uma prática comum nos laboratórios de biologia molecular. Lunn e Sansone (1987) indicam uma série de precauções no uso desta substância que possui grande afinidade pela molécula de DNA, sendo classificada como de ação mutagênica por Douthard (1973). As alterações executadas propiciaram uma menor contaminação pelo brometo de etídio, durante a rotina laboratorial, executando-se a coloração do gel após a eletroforese. Processos de inativação dos resíduos contendo brometo de etídio também foram utilizados um passo importante para o desenvolvimento de novas técnicas como a sugerida por Reiniger *et al.* (2004), que implementa uma reciclagem da agarose em laboratórios de biologia molecular.

De maneira geral, este trabalho contribui para o estudo da detecção de organismos geneticamente modificados, demonstrando a grande sensibilidade das atuais técnicas de biologia molecular. A divulgação destes protocolos segundo Cavalli (2001) torna-se necessária a fim de gerar um maior controle sobre a produção e o consumo dos alimentos transgênicos.

9- Conclusões:

- Os efeitos da radiação gama de ^{60}Co e de aceleradores de elétrons na detecção de variedades de milho geneticamente modificados ou de alimentos que o possuam como ingrediente é inexistente, utilizando-se a PCR logo após a extração do DNA.

- Uma rotina laboratorial na identificação de organismos geneticamente modificados foi desenvolvida com sucesso, utilizando-se uma tecnologia própria “*in house*”, que apesar de mais trabalhosa, mostrou-se mais acessível do que a utilização de kits comerciais.

- A única modificação observada entre a detecção dos alimentos irradiados para os não irradiados foi o tempo de duração das amostras de DNA mantidas em geladeira. Esta modificação poderia ocasionar falhas na detecção de amostras geneticamente modificadas originando falsos negativos.

9- Referências Bibliográficas:

AHMED, M. Up-to-date status of food irradiation. **Radiat. Phys. Chem.**, Oxford, v.42, n1-3, p.245-251, 1993.

AN-HUNG FU.; SEBRANEK, J.G. and MURANO, E.A. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* and Quality attributes of Cooked Pork Chops and Cured Ham after Irradiation, Reprinted from **J. Food Sci**, 60 (5): p.1001-1005, 1995.

ANVISA. Resolução RDC número 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico para irradiação de alimentos. Publicada no **Diário Oficial da União** de 29 de janeiro de 2001.

AQUINO, S. **Efeitos da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de grãos de milho inoculadas artificialmente.** 2003. Dissertação de mestrado – IPEN autarquia associada a Universidade de São Paulo.

ARMSTRONG, C.L.; PARKER, G.B.; PERSHING, J.C.; BROWN, S.M.; Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop Science**, v.35, p.550-557, 1995.

ATLAS SOCIO-ECONÔMICO, Disponível em: <<http://www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=265>> acessado em 25/08/2005.

BARRY, B. D.; DARRAH, L.L.; HUCKLA, D.L. Performance of transgenic corn hybrids in Missouri for insect control and yield. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n. 3, p. 991-999, 2000.

BINSFELD, P.C. Análise diagnóstica de um produto transgênico. **BioTecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.2, n.12, p.16-19, 2000.

BRASCH, A.; HUBER, W. Ultrashort application time of penetrating electrons: a tool for sterilization and preservation of food in the raw state. **Science**, Washington, v.105, p.112-117, 1947.

BRIGIDE, P. **Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) irradiados.** 2002. Dissertação (Mestrado) –Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

BURKNESS, E. C.; HUTCHION, H. C.; WEINZIERL, R. A. Efficacy and risk efficiency of swett corn hybrids expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin for lepidopteran pest management in the Midwestern US. **Crop Protection**, v. 21, p. 157-169, 2002.

BURTIN, G. D.; LEE, D.; WILSON, D. M.; McPHERSON, R. M. Evaluation of YieldGard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm **Florida Entomologist**, v. 84, n.1, p. 37-42, 2001.

CAVALLI, S.B. Food safety: the approach to transgenic foods, **Rev. Nutr.** Campinas, v.14 suppl.10, 2001.

CENA, Histórico. **Trinta Anos em CENA.** Disponível em: <http://www.cena.usp.br/historico/historico.htm> acessado em 15/05/2004.

CLIPPING IPEN, disponível em : <http://www.ipen.br/scs/noticias/midia/2005/jcg27012005.htm>, Acesso em 18/06/2005.

CODEX ALIMENTARIUS. **General standard for irradiated foods.** vol. XV. 1983.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. – Comunicado Número 15 – Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/ctnbio/legis/comunicados/015.htm> Acesso em: 26/04/2004.

CREDE, R. G.; FANARO, G. B.; GUEDES, L. T.; SADUNDJIAN, I. T.; AQUINO, S.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Viabilidade no uso da PCR na detecção de OGM's em alimentos irradiados., IN: **International Nuclear Atlantic Conference**, 2005.

DELINCÉE, H. Rapid detection of irradiated frozen hamburgers. **Rad. Phys. Chem.** v. 63: 3-6, p. 443-446, 2002.

DERR, D.D. Progress of food irradiation in the United States. **Radiat. Phys. Chem.**, Oxford, v.48, p.362-363, 1996.

DICKINSON, J.H. The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods, **Lett. Appl. Microbiol.** n20, p.212, 1995.

DIEHL, J. F. Food irradiation: is it an alternative to chemical preservatives ? **Food Addit. Contam.** London, v.9, p.409-416, 1992.

DIEHL, J. F. **Safety of irradiated foods.** New York: Marcel Dekker, 454p, 1990.

DIEHL, J.F.- How it all began. In: DIEHL, J.F. **Safety of irradiated food.** New York: Marcel Dekker, p.1-7. 1995.

DIEHL, J.F. Will irradiation enhance or reduce food safety? **Food Policy**, April, p.143-151, 1995.

DOUTHARD, R. J. Ethidium bromide, **Biochemistry**, v.12, p.214, 1973
Disponível em:
http://www.qca.ibilce.unesp.br/prevencao/produtos/brometo_.html acessado em: 03/03/2004

DUARTE AGUILAR, J.A. and ARTHUR, V. Dose letal de radiação gama para ovos de *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1865) (Lepidoptera: Pyralidae), traça do arroz. **Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)**, v.51, n.1, p.191-194, 1994

EMBRAPA, Disponível em:
<<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>> acessado em 15/10/2005.

EVANGELISTA, J. Alimentos Irradiados, IN: **Alimentos um estudo abrangente.** São Paulo, Atheneu, cap. 6, p. 135-169, 1992.

FDA. Department of Health and Human Services Irradiation in the production, processing and handling of food. **Fed. Reg.**, v. 62, n. 232, 64107-64121, 1997.

FISCHHOFF, D. A.; BOWDISH, K. S.; PERLAK, F. J.; MARRONE, P. G. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Technology**, v.5, p. 807-813, 1987.

Folha de São Paulo **China recusa novo carregamento de soja brasileiro.** Pág: A16, Terça-feira, 01/06/2004.

Folha de São Paulo **Transgênicos já são consumidos no Brasil**, pág: A16, Quarta-feira, 21/06/2000.

GACHET, E. Detection of genetically modified organisms by PCR: a brief review of methodologies available, **Trends in Food Scien. Tecnol.** v.9, p.380, 1999.

GOLDBLITH, S.A. Historical development of food irradiation. In: **Food Irradiation**, Proceedings of a Symposium, Karlsruhe, junho 1966, International Atomic Energy, Viena, p.3. 1966.

GREINER, R. Engenharia genética produz alimentos modificados. **Notícias SBAN**, São Paulo, n.2, p.3-4, 1999.

GREINER, R. Models Systems for developing detection methods for foods derived from genetic engineering. **Journal. Food Comp. Anal.**, n.10, p.28, 1998.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H.; Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods, **Food Control**, article in press, 2004.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Implicações dos transgênicos na sustentabilidade ambiental e agrícola. **História, Ciências, Saúde Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p.481-491, 2000.

HIRATA, M.H. Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas à Nutrição, in: **V congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição – SBAN**, 1999.

HOFFMAN, M.A. Preocupações e conseqüências negativas do uso de plantas transgênicas. **Plantio Direto**, Passo Fundo, n.51, p.26-28, maio/jun. 1999.

HUANG, F.; BUSCHMAN, L. L.; HIGGINS, R. A.; LI, H. Survival of Kansas dipel-resistant European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on Bt and non-Bt corn hybrids. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 3, p. 614-621, 2002.

IAEA.- Food irradiation with emphasis on process control and acceptance in Asia. **IAEA TECDOC-871**, 2001..

IAEA.- Food irradiation with emphasis on process control and acceptance in Asia. **IAEA TECDOC-871**, 1996.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=472 > acessado em 02/11/2005.

ICGF. Control of irradiated food in trade - **A compilation of principles and international recommendations for regulatory control measures**. Vienna, p.15. 1995.

ICGF. Facts about irradiation, International consultative, **Group on Food Irradiation**, Vienna, Áustria, 1999.

IKUNO, A.A.- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), In: **Curso Básico de Biologia Molecular Aplicada** – Instituto Biológico de São Paulo., 2000.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Training manual on food irradiation technology and techniques. Vienna, (Technical reports Series n. 114) 1982.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Wholesomeness o irradiated foods. Vienna, (Technical reports Series n. 178) 1981.

IPEN, Sobre o IPEN – Histórico, principais convênios e eventos técnicos. Disponível em: http://www.ipen.br/ipen_p/sobre-ipen/historico/historico-principais-convenios.html acessado em 20/08/2004.

JAMES, D.; SCHMIDT, A.; WALL, E.; GREEN, M. Reliable Detection and Identification of Genetically Modified Maize, Soybean, and Canola by Multiplex PCR Analysis, **J. Agric. Food Chem.** N.51, p.5829-5834, 2003.

KÄFERSTEIN F.K.; MOY, G.G. Public health aspects of food irradiation, **Journal of Public Health Policy**, v.14, n.2, Summer 1993.

KILCAST, D. Effect of irradiation on vitamins. **Food Chem.**, Barking, v.49, p.157-164, 1994.

KOZIEL, M. G.; BELAND, G. L.; BOWMAN, C. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Tecnology**, v. 11, p. 194-200, 1993.

LANDGRAF M. Novos Patógenos de Interesse em Alimentos, In: **Simpósio comemorativo dos 30 anos da SBCTA** (Soc. Brasileira de Ciência e Tec. de Alimentos),1997.

LAUTER, F. R. GMO labeling: the need for and status of GM-DNA quantification. **Cercal foods World**, v.45; p.427-428, 2000.

LIPP, M.; BLUTH, A.; EYQUEM, F.; KRUSE, L. Validation of method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. **Eur. Food Res. Technol.** In press, 1999.

LIPP, M.; ANKLAM, E.; STAVE, J.W. Validation of a immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials. **AOAC Int**, v.83; p.919-927, 2000.

LOAHARANU, P. Food irradiation in developing countries: A practical alternative. **IAEA Bulletin**, p.30-35, 1994.

LORINI, I. Armazenagem adequada evita perdas de grãos armazenados. Notícia Número 59/2001 – Data: 13/12/2001 – Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/not0159.htm> . Acessado em 21/07/2004.

LUNCH, R.; WISEMAN, B. R.; PLAINSTED, D. Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing Cry1A(b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm. **Journal Economic Entomology**, v. 92, n.1, p. 246-252, 1999.

MARTINELLI, S. **Efeito de híbridos de milho Bt expressando toxinas de *Bacillus thuringiensis* sobre insetos herbívoros e agentes de controle biológico em condições de campo.** Ribeirão Preto, 2001. 139p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

MASEFIELD, J.; DIETZ, G.R. Food irradiation: the evaluation of commercialization opportunities. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.**, Boca Raton, v.19, p.259, 1983.

MB. ASSOCIADOS, Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm> acessado em 12/11/2005.

MEYER, R. Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction (PCR) using Flavr Savr tomato as an example. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** v.200; p.583-586, 1995.

MEYERS, H. B.; JOHNSON, D. R.; SINGER, T. L. Survival of *H. zea* Boddie on Bollgard cotton. In: BELTWISE COTTON CONFERENCE, 2., Memphis, 1977. **Proceedings**. Memphis: National Cotton Council, p. 1269-1271, 1997

MILLSTONE, E.; BRUNNER, E.; MAYER, S. Beyond 'Substantial equivalence'. **Nature**, London, v.401, n.6753, p.525-526, 1999.

MOMMA, A.N. Rotulagem de Plantas Transgênicas e o Agronegócio. (Depoimento à Câmara dos Deputados, 13 de abril de 1999). **Revista de Direito Ambiental**, v.16, n.4, p.153-162, 1999.

MUÑOZ, R.B.- **Química de radiaciones de los alimentos irradiados**. Quito: Escuela Politecnica Nacional, p. 1-37, 1985.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P.; Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.18, n.1, p.81-116, 2003.

PAULI, G.; TARANTINO, L. FDA regulatory aspects of food irradiation. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.58, p.209-212, 1995.

PAVAN, C. As organizações internacionais apóiam os transgênicos, In: **Transgênicos, você tem direito de conhecer**, também disponível em www.cib.org.br, Conselho de Informações sobre Biotecnologia, 2005.

PERLAK, F. J.; STONE, T. B.; MUSKOPF, Y. M. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Molecular Biology**, v. 22, p. 313-321, 1993.

PERLAK, F. J; DEATON, T. A.; ARMSTRONG, R. L. Insect resistant cotton plants. **Bio/Technology**, v. 8, p. 939-943, 1990.

PESSOA, A. Produção de Milho no Brasil, **Ministério das Relações Exteriores**, Disponível em: <http://www.mre.gov.br/cdbrazil/itamaraty/web/port/economia/agric/producao/index.htm> acessado em 12/12/2004.

PETRANTONIO, P. V.; FEDERICI, B. A.; GILL, S. S. Interaction of *Bacillus thuringiensis* endotoxins with the insect midgut epithelium. In:

THOMPSON, S. N.; **Parasites and pathogens of insects**. New York: Academic Press, 1993. v.2, cap. 3, p. 55-79.

PIETSCH, K.; WAIBLINGER, H. U. Quantification of genetically modified soybeans in food with the LightCycler system. **Springer-Verlag**, Berlin, 2001.

POLLARD, E. C. Phenomenology of radiation effects on microorganisms. In: SPRINGER-VERLAG (Ed.). **Encyclopedia of Medical Radiology**. New York, 1966. v. 2(2), p. 1-34.

POTENZA, R. M. **Avaliação de produtos naturais irradiados para o controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleóptera: Curculionidae) e *Blattella germânica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae)**. 2004, tese de doutorado, IPEN – autarquia associada à Universidade de São Paulo.

PROCTOR, B. E.; GOLDBLITH, S.A. Food processing with ionizing radiation. **Food Technol.**, Chicago, v.5, p.376-380, 1951.

REINIGER, L.R. S.; ANTHONISEN, D.; CHOER, E.; SEPEL, L. M. N. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. **Ver. Cienc. Rural**, v.34, n.5, p. 1-5, Santa Maria, sept./oct., 2004.

RELA, R. P.; CALVO, NAPOLITANO, C. M.; KODAMA, Y.; OMI, N.M.; COSTA, F. E. Programa de qualificação de um irradiador multipropósito de Cobalto-60 tipo compacto. IN: **International Nuclear Atlantic Conference – INAC**. 2005.

ROGAN, G. J.; DUDIN, Y. A.; LEE, T. C. Immunodiagnostic methods for detection of Roundup rReady soybeans. **Food Control**, v.10, p. 407-414, 1999.

ROMANO, E. Extração de DNA de Plantas, **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.II, n.9, p.40. 1999.

ROSSI, A. M.; JESUS, E. F. A radiação que conserva. **Ciência Hoje**, v. 17, n. 100, p. 24-29, 1994.

SILVA, A.R.- Faltam provas. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v.20, n.8, p.59-61, 2000.

SING, H.; LILIES, J.N. Effects of gamma rays on the adult's lethality and reproductive potential of lesser grain bores adults. **Journal of Economic Entomology**, v.65, n.3, p.656-659, 1972.

SPALDING, D. H. et al. Methyl bromide and phosphine fumigation injury to avocados and mangoes. **Proc. Fla. Statet Hortic. Soc.** n..90, pp.268-270, 1977.

SPERS, E.E.; KASSOUF, A.L. A abertura de mercado e a preocupação com a segurança dos alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.46, p.16-26, 1996.

STAVE, J. W.; Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO. **Food Control**, v.10; p.367-374, 1999.

STAVE, J. W.; DURANDETTA, D. GM crop testing grows amid controversy. **Today's Chemist at Work (American Chemical Society)**, June, p.32-37, 2000.

STAVE, J.W. Detection of new or modifieed proteins in novel foods derived from GMO – future needs. **Food Control**, v.10, p.367-374, 1999.

TABERLET, P.; Gielly, L.; Pautou, G. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Mol. Biol.** v.17, p.1105-1109, 1991.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. “9 CFR Parts 317, 318 and 381 – Irradiation of Meat and Meat Products: Proposed Rule”, **Federal Register**, Washington, v.64, n.36, February 24, p.9089-105, 1999.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. “21 CFR PART 179 – Irradiation in the production, processing and handling of food. **Federal Register**, Washington, v.62, n.232, p.64107-64121, 1997

URBAIN, W.M. **Food Irradiation**. Orlando: Academic Press, 315p. 1986.

US. Food and Drug Administration. Irradiation in the production, processing and handling of food, Final Rule, **Fed. Reg.**, Washington, v.51, p.13376-13399, 1986.

USDA United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, **Guidebook for the Preparation of HACCP Plans and the Generic HACCP Models**, Federal Register/Rules regulations – HACCP-8, Washington, 51, May 1999.

VAN DEN EDE, G. L.; LIPP, M.; EYQUEM, F. Validation of a double competitive polymerase chain reaction method for the quantification of GMO's in raw materials. **EUR.** p.639-676, 2000.

VIEIRA, N. F. Encarando Preconceitos. **Alimentos e tecnologia**, n. 20, ano 3, p. 32-34, 1988.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H. **Avaliação dos efeitos da radiação ionizante de ^{60}Co em propriedades físicas, químicas e nutricionais dos feijões *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** 1998. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

VILLAVICENCIO, A.L.C.H.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCÉE, H. Application of a rapid screening method to detect irradiated meat in Brazil. **Rapid. Phys. Chem.** V. 57: 3-7, p. 295-298, 2000.

WALKER, K. A.; HELLMICH, R. L.; LEWIS, L. C. Late instar European corn borer tunneling and survival in transgenic corn hybrids. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 4, p. 1276-1285, 2000.

WHO. "High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy". TECHNICAL REPORT SERIES 890, Geneva, 2001.

WHO. High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Study Group, Technical Report Series 890, Geneva, 1999.

WHO *Surveillance Programme. Sixth report of WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe.* FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin, 1995.

WILLIAMS, W. P.; SAGERS, J. B.; HANTEN, J. A. Transgenic corn evaluated for resistance to fall armyworm and southwestern corn borer. **Crop Science**, v.37, p. 957-962, 1997.

WITTEWER, C. Rapid cycle real-time PCR: methods and applications. **Springer-Verlag**, Berlin. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- *High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy.* Disponível em: <http://www.who.int/das/justpub/irrad.htm> . Acessado em 21/07/2004

ZIMMERMANN, A.; LUTHY, J.; PAULI, U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** v.207, p. 81-90, 1998.