

Utilização de PCR para diagnóstico de Milho Geneticamente Modificado

Amanda Rocha Pietrochinski (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) amanda_pietroch@hotmail.com
Jullie Angel Ruths (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) jullie-ruths@hotmail.com
Renata Samulak (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) renatasamulak@hotmail.com
Juliana Vitória Messias Bittencurt (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) julianavitória@hotmail.com

Resumo:

O milho, um dos alimentos mais importantes no Brasil é um dos maiores focos na pesquisa para Alimentos Geneticamente Modificados. O consumo desses alimentos está aumentando, mesmo que muitas vezes os consumidores não estejam cientes disto. Para maior informação dos consumidores, é necessária a detecção dos Organismos Geneticamente Modificados (OGM) nos alimentos, a fim de evitar maiores transtornos como alergias e doenças não diagnosticadas. Para detecção de transgênicos, um dos métodos mais utilizados é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) onde é feita a ampliação do DNA para visualização da contaminação na amostra. Esse método é utilizado também no diagnóstico de doenças hereditárias e HIV. A técnica de PCR é muito utilizada devido a sua rapidez, sensibilidade e simplicidade, além de ser barata e segura. Devido à necessidade de detecção de transgenia em grãos, com eficiência e rapidez, esse trabalho tem como objetivo demonstrar a importância e eficácia do método de PCR na detecção de Organismos Geneticamente Modificados em grãos, principalmente no milho.

Palavras chave: Milho, Organismos Geneticamente Modificados, PCR

Use of PCR for diagnosis of Genetically Modified Organisms

Abstract

Corn, one of the most important foods in Brazil is a major focus in research for Genetically Modified Foods. The consumption of these foods is increasing, even though consumers often are not aware of this. For most consumer information is required detection of Genetically Modified Organisms (GMOs) in food, in order to avoid further problems such as allergies and diseases not diagnosed. For detection of GMOs, one of the most used methods is the Polymerase Chain Reaction (PCR) which was enlarged for visualization of DNA contamination in the sample. This method is also used in the diagnosis of hereditary diseases and HIV. The PCR technique is widely used because of its speed, sensitivity and simplicity, as well as being cheap and safe. Due to the need for detection of transgenic grains, rapidly and efficiently, this study aims to demonstrate the relevance and effectiveness of the PCR method for detection of Genetically Modified Organisms in grains, mainly corn.

Key-words: Corn, Genetically Modified Organisms

1. Introdução

O milho (*Zea mays L.*) é considerado uma hortaliça que é utilizada para alimentação humana na forma de fubá, farinha de milho, amido e quirera, normalmente utilizados para fabricação de bolos, sorvetes e outros alimentos. (BRASIL, 2011)

A produção de milho tem crescido em todo território nacional nos últimos anos, sendo visto como promissor, incentivando outros produtores a migrar para o negócio. O que vem também estimulando os produtores é o aumento na demanda do produto no mercado. (BRASIL, 2011)

Segunda pesquisa do USDA (United States Department of Agriculture), o consumo mundial vem crescendo desde 2005 até 2012, onde passou de 688,15 à 880,59 milhões de toneladas de milho, e o Brasil apresentou um crescimento de 35,0 para 73,0 milhões de toneladas, destacando-se em quarto lugar. (FARSUL, 2012)

O milho é uma excelente fonte de energia, devido ao seu valor nutricional onde predominam carboidratos e lipídeos. O óleo contido no gérmen do milho obtém uma composição de ácidos graxos, principalmente o ômega 6 que é de grande importância, para a prevenção de doenças cardiovasculares e combate ao colesterol. (PAES, 2006)

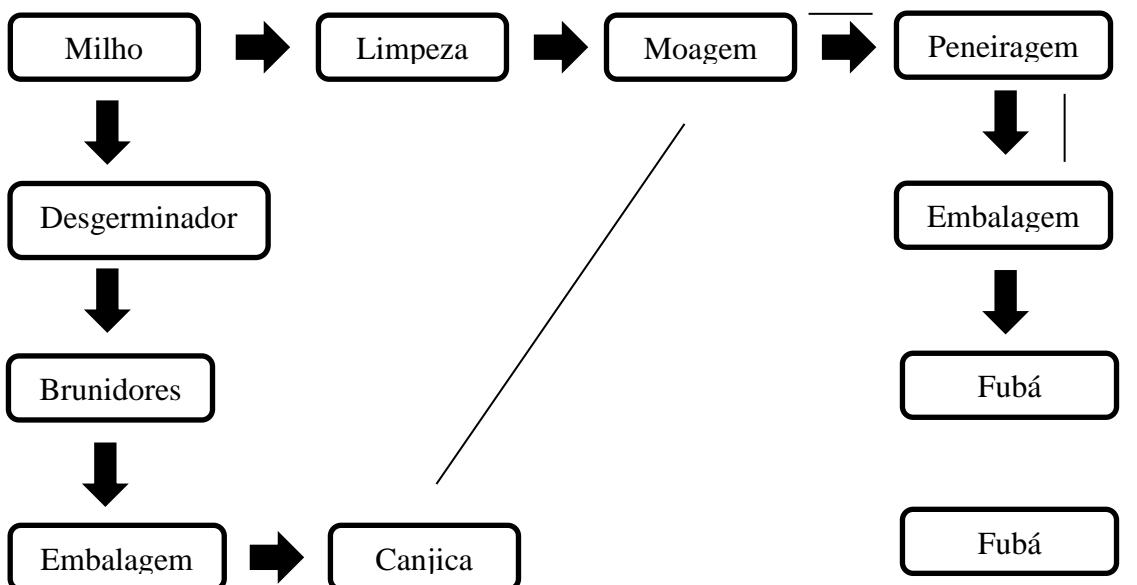
2. Milho e seus derivados

O milho é um dos cereais mais consumidos e cultivados em todos os continentes, pela sua facilidade no plantio e colheita, sendo originário da América espalhando-se por todas as outras regiões. Atualmente há aproximadamente 150 espécies de milho, sendo diferenciadas pela cor e formato dos grãos. (ABIMILHO, 2012)

Possui alto valor nutritivo pelo fato de que na sua industrialização é mantida a casca que é uma grande fonte de fibras que é fundamental para a eliminação de toxinas no organismo humano. (ABIMILHO, 2012)

O milho é uma importante fonte de energia, proteína, gordura e fibra, chamando atenção das indústrias alimentícias. Há vários processos para obtenção de produtos derivados do milho como o fubá, canjica e farinha de milho. (GERALDI, 2012)

De acordo com Camargo (1984) a indústria de derivados do milho tem no seu processo de fabricação inúmeras operações, as quais estão demonstradas na figura abaixo:



Fonte: Tecnologia dos Produtos agropecuários

2.1 Fubá Comum

Fubá é o produto feito através do milho amarelo e obtido por moagem do milho integral. O milho é conduzido para a limpeza onde por meio de peneiras e ventiladores, as sujidades e impurezas são retiradas. (CAMARGO, 1984)

Segundo Camargo (1984) após a retirada das impurezas, os grãos vão para o moinho, normalmente de martelo, onde os grãos serão quebrados e passam por uma peneira, já sendo transferidos para a embalagem. Como o fubá foi gerado através de milhos integrais moídos, a sua composição é a mesma do milho.

2.2 Canjica

A canjica é um produto obtido através da separação da casca e do germe do milho. Após a limpeza do milho, ele é colocado em canjiqueiras que são máquinas degerminadoras que fazem o despeliculamento (retirada da casca) e a desgerminação (retirada do germen). (CAMARGO, 1984)

A desgerminadeira fraciona o milho em canjica e farelo de germe. O grão de milho é previamente umedecido, a caixa alimentadora da desgerminadeira funciona como um silo pulmão e após o farelo é seco. (GERALDI, 2012)

O material cai numa peneira que retém a canjica e deixa passar o farelo que é constituído de germe e casca. A canjica é polida nos brunidores e embalada. Na canjica há aproximadamente 72,5% de carboidrato, 12% de umidade, 9% de proteína, 5% de lipídeos, 1% de fibra e 0,5% de cinza. (CAMARGO, 1984)

Segundo o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), a canjica é classificada segundo o tamanho, presença de tegumento, coloração e qualidade. (ARAÚJO, et, 2009)

2.3 Fubá Mimoso

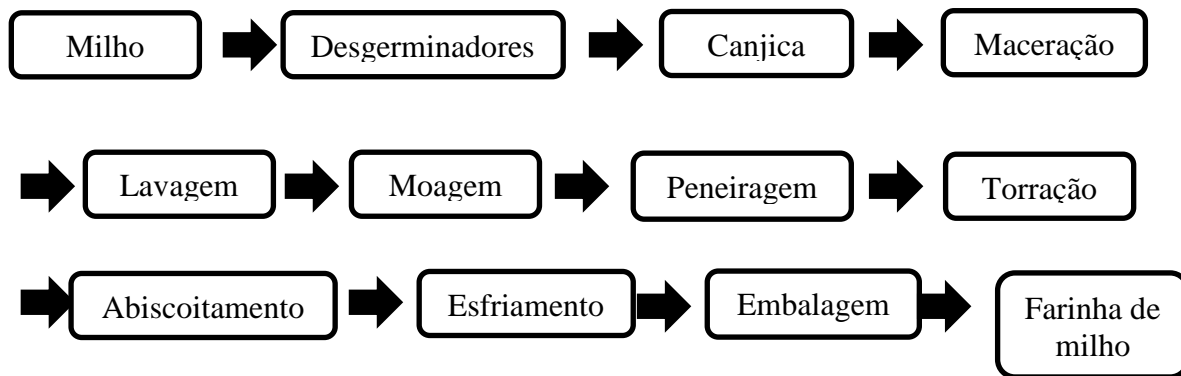
O fubá mimoso é obtido através da moagem da canjica. A diferença do fubá mimoso e do fubá comum é a granulação, onde para o fubá mimoso ela é mais fina. Isso ocorre pelo fato de que a casca e o germen já não estão mais presentes. (CAMARGO, 1984)

A composição do fubá mimoso é constituída basicamente de amido, pois os lipídeos, proteínas e fibras foram descartados no processamento. Isso favorece no seu tempo de vida útil, pois não irá rançar, uma vez que os lipídeos são poucos. (CAMARGO, 1984)

2.4 Farinha de milho

A farinha de milho inicia-se com o processo da canjica, onde é feita a maceração para amolecer os grãos. A seguir os grãos são lavados e moídos em moinhos de pedra ou moinhos de disco. A massa obtida desse processo passa por uma peneira para separar os gumos e após são levadas para os fornos de alvenaria para secagem. (CAMARGO, 1984)

Após a etapa da torração, tem o abiscoitamento da farinha, onde os beijus são formados. Depois do resfriamento o produto é armazenado nas embalagens. A cor da farinha só irá depender da cor do milho que foi usado no processo, podendo ser o milho amarelo ou branco. (CAMARGO, 1984)



Fonte: Tecnologia dos Produtos agropecuários

3. Milho Geneticamente Modificados

Organismos Geneticamente Modificados (OGM) podem ser definidos como uma entidade biológica em que o material genético foi alterado, de uma maneira em que a natureza é incapaz de reproduzir. Essa técnica permite que genes individuais sejam transferidos de um organismo para outro, criando plantas geneticamente modificadas. Essa tecnologia está sendo utilizada para maior proteção das plantas, onde os códigos genéticos transferidos são resistentes a pragas, insetos, vírus e herbicidas. (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013)

A rotulagem dos alimentos transgênicos é obrigatória em vários países, principalmente os europeus. (ZIMMERMANN, 2000)

Segundo a Legislação Brasileira (2003) para a comercialização de qualquer produto ou ingrediente que contenha mais de um por cento de organismos geneticamente modificados em sua composição devem informar a natureza do mesmo.

Para a informação da presença de Organismos Geneticamente Modificados deve conter nas embalagens o símbolo transgênico que é apresentado na forma de um T inserido em um triângulo equilátero amarelo. (ANVISA, 2003)

A rotulagem é de grande importância pelo fato de que atualmente a produção de grãos geneticamente modificados no Brasil, atinge exatos 58,24% segundo pesquisa do IBGE. No Paraná, a produção de milho transgênico chega a 90,9%. (ABRASEM, 2013)

Segundo Carneiro (2013), o milho tem sido alvo de muitas pesquisas para manipulação genética. A EMBRAPA, por exemplo, desenvolveu técnicas de melhoramento genético de biologia molecular, com o objetivo de produzir novas linhagens de milho melhoradas nutricionalmente.

De acordo com Guertler (2010), o cultivo global de milho transgênico chegou a 41,1 milhões de hectares em 2009, sendo caracterizado pela maior resistência a insetos e pragas e tolerância a herbicidas.

As pesquisas estão caminhando para um milho adaptado ao clima temperado, portanto, a tecnologia está seguindo para a produção de linhagens de milho transgênica adaptada ao clima tropical e subtropical. (CARNEIRO, 2013)

Houve um significativo aumento na produção de transgênicos, como na safra de 2012/13, estão sendo disponibilizadas cerca de 260 cultivares convencionais de milho e 216 cultivares transgênicos para o controle de lagartas. (CRUZ, 2013)

Uma das bactérias mais utilizadas no milho transgênico é *Bacillus thuringiensis*. O milho transgênico com atividade inseticida é conhecido como milho Bt, pois ele é transformado por uma toxina isolada da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). A toxina produzida por essa bactéria age como inseticida especificamente para larvas de alguns insetos. (MENDES, 2009)

Essa bactéria é gram positiva e ocorre naturalmente em diversos habitats como o solo, resíduos de grãos, poeira, água, matéria vegetal e insetos. (CARNEIRO, 2009)

A evolução do uso de milho Bt nos transgênicos é acelerada. Apesar de sua recente liberação para utilização nas lavouras comerciais, o milho Bt é conhecido pelo agricultor brasileiro desde seu lançamento nos Estados Unidos por volta de 1998. (DUARTE, 2009)

3.1 Benefícios e Malefícios

Não se sabe ao certo os prós e contras da utilização de organismos geneticamente modificados na alimentação.

A transgenia vem sendo uma das tecnologias mais usadas para conseguir uma produção maior de grãos e com as mesmas propriedades nutricionais. Isso só é possível pelo fato de que os alimentos transgênicos possuem uma característica em que há uma maior proteção da planta em relação aos fungos, herbicidas e vírus, mantendo as características nutricionais e sensoriais dos alimentos. (PURCINO, 2009)

Outro benefício visando à conservação e preservação do ambiente é a diminuição do uso de agrotóxicos, levando em consideração que o gene da planta tem características que as protege de pragas e fungos. (PURCINO, 2009)

É necessária fazer novas pesquisas sobre a segurança alimentar dos produtos que contenham organismos geneticamente modificados, mas de acordo com informações científicas qualificadas referentes ao milho geneticamente modificado, não foi identificado qualquer efeito prejudicial à saúde humana. (EMBRAPA, 2007)

De acordo com alguns experimentos sobre os riscos potenciais da utilização de transgênicos na indústria e agricultura, podem surgir problemas em sua aplicação em longo prazo. (FRAGOSO, 2008)

Os maiores malefícios citados pelo Greenpeace (2004) é a contaminação genética ocasionada pelo cruzamento de OGMs e plantas convencionais, o surgimento de superpragas que são resistentes a herbicidas e com isso o aumento da utilização de herbicidas.

Em relação à saúde humana, o que se sabe é que os transgênicos tem causado um aumento de casos de alergia, principalmente em crianças. Outro ponto é o aumento da resistência a antibióticos e a produção de substâncias tóxicas e carcinogênicas ao homem. (GREENPEACE, 2004)

3.2 Rotulagem de Alimentos Transgênicos

Estima-se que 70% dos alimentos ingeridos pelos consumidores é geneticamente modificados, porém, o consumidor não é ciente disto, pois normalmente esses alimentos não são rotulados informando ao público a distinção genética. (HELM, 2007)

A grande comercialização de alimentos geneticamente modificados tem levado a rotulação desses produtos para proteger os consumidores, que é um direito prescrito na Legislação: Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003 - Regulamenta o direito à informação, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. (WU, 2009)

Segundo essa mesma Legislação o consumidor deverá ser informado sobre a espécie doadora do gene no local da identificação dos ingredientes. Aos alimentos e ingredientes que não contenham nem sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados que tenham produtos similares e transgênicos no mercado brasileiro será facultada a rotulagem “livre de transgênicos”. (ANVISA, 2003)

4. Detecção de Transgênicos da Indústria

A detecção da presença de organismos geneticamente modificados é de extrema importância no mundo inteiro, pois existe um limite para a presença desses organismos em m produto final, e as pessoas tem o direito de saber o que consomem. (SANTILIANO, 2010)

Um dos métodos mais utilizados para a detecção de Organismos Geneticamente Modificados é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). (ZIMMERMANN, 2000)

Os métodos para detecção de OGM são baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), em virtude da alta estabilidade da molécula ADN e capacidade da sua amplificação a partir de materiais processados. (WU, 2009)

Alguns métodos vêm sendo estudados para posterior execução como um desenvolvimento da Universidade Federal de Viçosa, que também tem como base a reação em cadeia da polimerase, mas o processo deve ser mais rápido e específico. Como por exemplo, o espectrômetro de massas tira uma fotografia dos extratos de isoflavonas, tornando a comparação entre os tipos de soja (transgênica ou convencional) mais precisa. (SANTILIANO, 2010)

Um método simples e barato é criado pela Embrapa Hortaliças, porém, o resultado sai somente em cinco dias. Numa mistura de água e glifosato (herbicida utilizado nas lavouras) em um tubo de ensaio, uma semente de soja, por exemplo, é colocada e permanecida por cinco dias. Após esse período, se a soja desenvolver raízes, significa que possui modificação transgênica. (SANTILIANO, 2010)

4.1 Método de PCR

A reação de polimerização em cadeia é uma técnica que permite a amplificação do DNA utilizando de uma reação enzimática catalisada por uma enzima termoestável que é a polimerase. (RESENDE, 2013)

Essa técnica ocorre em três etapas, onde a primeira é a desnaturação que consiste na separação da dupla- fita de DNA para sua posterior amplificação, a segunda etapa é a hibridização que é a ligação do primer com o DNA a ser amplificado e a terceira etapa é a extensão onde ocorre a polimerização. (RESENDE 2013)

O método de PCR inicia-se em um processo qualitativo, onde as amostras do DNA são extraídas do material a ser analisado e são amplificadas. No processo de amplificação, as amostras recebem outros segmentos de DNA como os “primers” que se ligam às sequencias transgênicas já conhecidas. (SANTILIANO, 2010)

A eletroforese é um processo em que a corrente elétrica separa as espécies carregadas eletricamente, havendo a separação dos fragmentos. O DNA é carregado negativamente, migrando para o pólo positivo. (ZAGO, 2013)

No termociclador, um aparelho de PCR que é feita a amplificação do DNA para análise da presença de DNA modificado na amostra. (RESENDE, 2013)

Quando a partir da ampliação é detectada uma contaminação, são realizados os testes quantitativos, utilizando técnicas aceitas internacionalmente. Essas técnicas determinam o percentual de contaminação existente na amostra que foi submetida à análise. (SANTILIANO, 2010)

Essa metodologia é bastante sensível, podendo identificar material transgênico em uma amostra onde ele se encontrada em apenas 0,1% do alimento. (SANTILIANO, 2010)

4.2 Aplicação do Método de PCR

Smith (2007) em seu estudo aplicou a técnica de PCR para avaliar e comparar a qualidade relativa do DNA em amostras de farinha de milho e amido de milho, utilizando métodos de extração diferentes como Nucleospin, Qiagen, Wizard, CTAB e Kingfisher.

O DNA foi extraído a partir de 2g de cada amostra e em seguida foi feita a quantificação do DNA para evitar a interferência de outras substâncias na análise. Concluiu-se que todos os métodos realizados garantiram a qualidade na recuperação do DNA amplificável. (SMITH, 2007)

Wu (2009) utilizou o método de PCR para detectar a quantidade de Topas, uma espécie de canola tolerante a herbicidas. O DNA foi extraído e purificado. As concentrações de DNA foram estimadas com um espectrofotômetro e posteriormente verificadas por eletroforese em gel de agarose. As amplificações de PCR foram efetuadas em um termociclador.

Os resultados esperados foram obtidos, embora a adequação desse métodos para tal análise precisa de validação de outros laboratórios para estabelecer a confiabilidade e reprodutibilidade da análise. (WU, 2009)

Além do mapeamento genético, existem inúmeras aplicações para a PCR: é usado no diagnóstico médico, detecção de doenças hereditárias, clonagem de genes, testes de paternidade, identificação de “impressões digitais”, detecção de polimorfismos. (CARRAPA, 2005)

É uma metodologia bastante utilizada para a detecção do vírus HIV, pois consegue detectar nas primeiras semanas após a infecção e obtém-se um resultado mais rapidamente que outros métodos utilizados. (CARRAPA, 2005)

4.3. Vantagens do método de PCR

Essa técnica é muito utilizada, pois ela é simples, rigorosa, consistem em uma alta sensibilidade e especificidade. É uma técnica rápida, barata e segura. (CARRAPA, 2005)

Suas maiores vantagem são a velocidade e facilidade de utilização, sua sensibilidade pois funciona com quantidades mínimas de DNA e robustez onde permite a amplificação de materiais degradados. (ZAGO, 2013)

5. Conclusão:

A utilização do método PCR é importante e eficaz na detecção de Organismos Geneticamente Modificados. Com essa metodologia é possível verificar a contaminação no DNA, possibilitando à indústria e ao produtor informarem nas embalagens de seus produtos a presença de transgênicos, além de ser um método rápido e seguro, aumentando o interesse das indústrias pelo mesmo.

6. Referências

ABIMILHO. O Cereal que enriquece a alimentação humana, 2012. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>> Acesso dia 19 set. 2013.

ABRASEM. Transgênicos sem Polêmica. Porto Alegre – RS, 2013. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/transgenicos-sem-polemica/>> Acesso dia 19 set. 2013.

ARAÚJO W. M. C.; MONTEBELLO N. P.; BOTELHO R. B. A.; BORGIO L. A. Alquimia dos Alimentos. Editora SENAC Distrito Federal, pág 348 a 352. Brasília, 2009.

ASCHERI J. L. R.; GERMANI R. Agroindústria do milho. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2011.

CAMARGO R.de; et al. **Tecnologia dos Produtos agropecuários**. São Paulo. Editora Nobel, 1ª edição, 1984.

CARNEIRO, A. A.; et al. **Milho Transgênico**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Pág 42 a 46. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio15/milho.pdf>> Acesso dia 09 set. 2013.

CARNEIRO A. A.; GUIMARÃES C. T.; VALICENTE F. H.; WAQUIL J. M.; VASCONCELOS M. J. V.; CARNEIRO N. P. Milho Bt: Teoria e Prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga. MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2009/circular/Circ_135.pdf> Acesso dia 19 set. 2013.

CARRAPA A.; ZÃO A.; COELHO J.; SANTOS J.; PEDROSA S. **Técnicas de Análise de DNA aplicadas a diagnóstico**. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2005.

CRUZ J. C.; QUEIROZ L. R.; FILHO I. A. P. Milho – Cultivares para 2012/2013. Embrapa Milho e Sorgo, 2013.

DUARTE J. O.; GARCIA J. C.; CRUZ J. C. Aspectos econômicos da produção de milho Transgênico. MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2009/circular/Circ_127.pdf> Acesso dia 19 set. 2013.

EL DASH A.; GERMANI R. Tecnologia de farinhas Mistas. Embrapa – SPI, Volume 2, Guaratiba, 1994.

FARSUL – Federação da Agricultura do Rio Grande do Sul. Relatório Econômico de 2012 e Perspectivas para 2013. Balanço 2012 do Agronegócio & Perspectivas para 2013 – Assessoria Econômica. Disponível em: <<http://www.farsul.org.br/arquivos/RELAT%20ECON%20MICO%202012.pdf>> Acesso dia: 19 set. 2013.

FILHO I. A. P.; CRUZ J. C.; SILVA A. R.; COSTA R.V.; CRUZ I. Milho verde. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, 2011.

FILHO J. F. F.; CAMPOS F. R. **A Indústria Rural No Brasil**. Revista De Economia E Sociologia Rural. Vol. 41 N° 4, 2003.

GERALDI C. A. Q.; et al. **Análise Econômico-Financeira De Um Novo Processo De Produção De Derivados De Milho**. ENGEVISTA, V. 14, n. 2. P. 185-195, 2012.

GERMANI R. Farinhas. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fdyq37cy02wx5a900e1ge5nthiafa.html>> Acesso dia 24 set. 2013.

GUERTLER P.; et al. **Long-term feeding of genetically modified corn (MON810) — Fate of cry1Ab DNA and recombinant protein during the metabolism of the dairy cow.** Livestock Science, Volume 131, pág. 250 a 259. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141310001460>> Acesso dia 04 set. 2013.

HELM S. E.; et al. **Real-Time Quantitative PCR Detection of Genetically Modified Corn in Commonly Consumed Foods in Infants and Toddlers.** Nutritional Science, Pepperdine University, Malibu, 2007.

MENDES S. M.; WAQUIL J. M.; VIANA P. A. Manejo Integrado de pragas em lavouras plantadas com milho geneticamente modificado com gene bt (Milho Bt). EMBRAPA – Milho e Sorgo, 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/milhoBT.htm> Acesso dia 19 set. 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Organismos Geneticamente Modificados.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/organismos-geneticamente-modificados>> Acesso dia 09 set. 2013.

PAES M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho.** Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas- MG, 2006.

PIRES A. J. V.; GARCIA R.; CECON P. R.; NEUMAN J.; NEIVA M.; SARMENTO P. **Amonização da Quirera de Milho com Alta Umidade.** Revista brasileira de zootecnia, v.28, n.6, p.1186-1193, 1999.

PURCINO, A. A. C.; WAQUIL, J. M. **Milho transgênico em favor do desenvolvimento.** Embrapa Milho e Sorgo, 2009. Disponível em: <<http://cib.org.br/em-dia-com-ciencia/artigos/milho-transgenico-em-favor-do-desenvolvimento/>> Acesso dia 12 set. 2013.

RESENDE L. V.. **Reação De Polimerização Em Cadeia (PCR).** Disponível em: <http://www.dag.ufla.br/site/_adm/upload/file/Luciane%20Vilela%20Resende/PCR_2_%5BModo_de_Compatibilidade%5D%5B1%5D.pdf> Acesso dia 16 set. 2013.

SANTILIANO F. C.; ALMEIDA B. R.. **Métodos de detecção de organismos Geneticamente Modificados.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, N.10, 2010. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2010b/metodos.pdf>> Acesso dia 13 set. 2013.

SECRETARIA DA FAZENDA. Milho E Seus Derivados. Pernambuco, 2013.

SMITH D. N.; MAXWELL P. W. Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn flour and cornstarch. Food Control, Volume 18, March 2007, Pages 236–242. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671350500229X>>. Acesso dia 02 set. 2013.

WU G.; WU, Y.; XIAO L.; LU C.; **Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified rapeseed Topas 19/2.** Food Chemistry, Volume 112, Issue 1, Pages 232–23. China, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608006365>> Acesso dia 13 set. 2013.

ZAGO T. M. **Métodos moleculares na prática clínica.** UNICAMP. Disponível em: <<http://www.caalunicamp.com.br/site/wp-content/uploads/2011/GEN%20TICA-M%20A%20todos-moleculares-na-pr%20tica-cl%20nica-Zago.pdf>> Acesso dia 16 set. 2013.

ZIMMERMANN A.; et al. **Event Specific Transgene Detection in Bt11 Corn by Quantitative PCR at the Integration Site.** LWT - Food Science and Technology, Volume 33, pág. 210 a 216, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643800906376>> Acesso dia 04 set. 2013.