



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**PRISCILLA DANTAS ROCHA**

**ESPECTROSCOPIA NIR E MODELAGEM SIMCA PARA DISTINÇÃO ENTRE  
SEMENTES DE ALGODÃO TRANSGÊNICOS E CONVENCIONAIS**

**CAMPINA GRANDE-PB  
2019**

PRISCILLA DANTAS ROCHA

**ESPECTROSCOPIA NIR E MODELAGEM SIMCA PARA DISTINÇÃO ENTRE  
SEMENTES DE ALGODÃO TRANSGÊNICOS E CONVENCIONAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Química da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Graduação em Licenciatura em Química.

**Área de concentração:** Analítica

**Orientadora:** Profa. Dra. Simone da Silva Simões

**CAMPINA GRANDE-PB  
2019**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

R672e Rocha, Priscilla Dantas.

Espectroscopia NIR e Modelagem SIMCA para distinção entre sementes de algodão transgênicos e convencionais [manuscrito] / Priscilla Dantas Rocha. - 2019.

38 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia , 2019.

"Orientação : Profa. Dra. Simone da Silva Simões , Departamento de Química - CCT."

1. Metodologias alternativas. 2. Algodoeiro. 3. Quimiometria. 4. Espectroscopia NIR. I. Título

21. ed. CDD 633.51



PRISCILLA DANTAS ROCHA

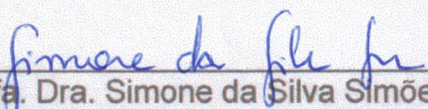
**ESPECTROSCOPIA NIR E MODELAGEM SIMCA PARA DISTINÇÃO ENTRE  
SEMENTES DE ALGODÃO TRANSGÊNICOS E CONVENCIONAIS**

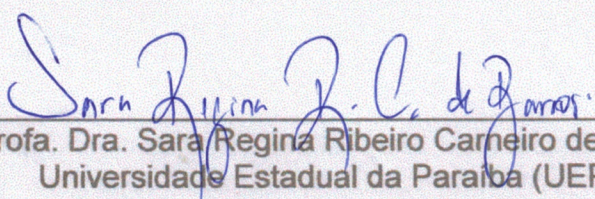
Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Departamento do  
Curso Licenciatura em Química da  
Universidade Estadual da Paraíba,  
como requisito à obtenção do título  
de Graduação em Licenciatura em  
Química

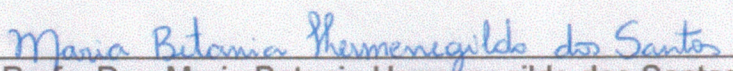
Área de concentração: Analítica

Aprovada em: 03/12/19.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Simone da Silva Simões (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Sara Regina Ribeiro Carneiro de Barros  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Betania Hermenegildo dos Santos  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

## **AGRADECIMENTO**

Primeiramente agradecer sempre a Deus pelas oportunidades, e por sempre abençoar o meu caminho, colocando pessoas muito abençoadas para me ajudar nessa caminhada.

Agradeço aos meus pais Isauro Dantas e Joseane Rocha pelo apoio, pelas palavras, pelos ensinamentos, por sempre me incentivarem a trilhar uma caminhada na fé, e por me incentivarem a ser uma pessoa independente e correr atrás dos meus sonhos, sem passar por cima de ninguém, tendo os pés no chão e respeitando o próximo.

Obrigada ao meu irmão Tássio, minha cunhada Iolanda por me presentear com a minha sobrinha Maria Cecília, com ela eu conheci o amor mais puro que uma pessoa pode conhecer e pela chegada em alguns meses do meu sobrinho Théo que eu não conheço ainda mais já amo tanto.

Um agradecimento mais que especial ao meu primo Luan Dantas que está seguindo comigo a tanto tempo, compartilhando o sonho de conquistar algo, e de construir um futuro melhor através dos estudos. E a minha prima Bruna Rocha que é mais que prima é minha irmã de alma que sempre está ao meu lado me ajudando.

Obrigada a Ingrid e a Juliana pela parceria para a coleta desses dados, onde por muitas vezes elas tiveram que coletar esses dados sem a minha presença, obrigada também pelo profissionalismo espero que vocês tenham muito sucesso na caminhada profissional.

Obrigada a Dr. Everaldo que sempre está me apoiando na Embrapa Algodão e me guiando para fazer sempre um ótimo trabalho.

Obrigada aos meus colegas e parceiros nas disciplinas Aline Regina e Rafael por alegrarem meus dias e a todos os meus amigos queridos que estão sempre me desejando vitória e sucesso.

Obrigada aos meus aos meus amigos e todos os familiares que tanto torceram por mim todos esses anos.

E por fim um agradecimento mais do que justo e necessário a minha orientadora Dra. Simone Simões que a princípio eu escutava muitos dos seus orientandos à chamando de Mãe, mais depois ela passou a ser mais do que isso

pra mim, ela passou a ser um anjo que Deus enviou pra minha vida, um ser humano magnífico, uma profissional excelente e uma incentivadora pra vida.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Análise de componentes principais (PCA) – primeira e segunda PCs no espaço tridimensional das variáveis.....	20
Figura 2: – Processo de Modelagem do SIMCA .....	21
Figura 3: Sementes de BRS 368 RF e BRS Aroeira. ....	24
Figura 4: Espectrofotômetro XDS near-infrared Rapid Content TM Analyser da FOSS Analytical.....	25
Figura 5: Espectro bruto das 20 amostras. ....	26
Figura 6: Espectro com o pré-processamento MSC das 20 amostras. ....	27
Figura 7: Análise de componentes principais (PCA) referente aos espectros brutos (A) e pré-processados com (B) MSC (C) SNV e (D) Suavização com janela de 9 pontos e polinômio Savitzky Golay de 2ª ordem.....	27-27
Tabela 1: Classificação SIMCA. ....	29
Figura 8: Poder de Classificação por variável .....	30
Figura 9: Poder de Discriminação por variável, destaque relacionado a região relacionada a estrutura alfa-hélice do peptídeo.....	31



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. OBJETIVO</b> .....	12
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	12
<b>2.2 Objetivo Específico</b> .....	12
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
<b>3.1 Organismo Geneticamente Modificados</b> .....	13
3.1.1 <i>Vantagens e Desvantagens dos OGMs</i> .....	15
3.1.2 <i>Metodologias convencionais para confirmação dos OGMs</i> .....	16
3.1.3 <i>Metodologias Alternativas para confirmação dos OGMs</i> .....	18
<b>3.2 Reconhecimento de Padrões</b> .....	19
3.2.1 <i>Análise de Componentes Principais (PCA)</i> .....	19
3.2.2 <i>SIMCA</i> .....	21
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	23
<b>4.1 Local do experimento</b> .....	23
<b>4.2 Amostras convencional e transgênica</b> .....	23
<b>4.3 Instrumentação</b> .....	24
4.3.1 <i>Espectroscopia NIR</i> .....	24
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>5.1 Análise Exploratória</b> .....	26
<b>5.2 Modelos de Reconhecimento de Padrões Supervisionados</b> .....	28
5.2.1 <i>Modelo SIMCA</i> .....	29
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	32
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33

## RESUMO

Transgênico é todo organismo cujo material genético sofreu alguma alteração na estrutura a partir da técnica do DNA recombinante (BECHANE, 2012) e são empregados a fim de obter determinadas características como aumento na produtividade, diminuição do uso de herbicidas. Na cultura do algodoeiro, utiliza-se essas técnicas para resolver alguns problemas como resistência a pragas. Assim surgiu a necessidade de controlar as culturas transgênicas para evitar a contaminação das culturas convencionais (CIB, 2018). Diante disso necessita-se fazer a detecção, identificação de eventos transgênicos. Alguns métodos convencionais são laboriosos, caros, demorados e não preservam as amostras. Deste modo o objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia alternativa baseada na espectroscopia NIR, para a identificação e distinção de sementes convencionais e transgênicas do algodoeiro, que ocorra de forma rápida, pouco onerosa, não destrutiva. Assim foram adquiridas 20 amostras de sementes de algodão, 10 convencionais e 10 transgênicas, cedidas pela EMBRAPA Algodão localizada em Campina Grande – PB. Os espectros NIR de todas as amostras foram registrados e uma análise exploratória dos dados foi realizada, a partir da técnica de Análise de Componentes Principais (PCA) pode-se observar uma tendência de separação entre as classes, e, assim conseguiu escolher o melhor pré-processamento a ser utilizado no desenvolvimento dos modelos de reconhecimento de padrões supervisionados, SIMCA. Tanto a PCA quanto o SIMCA mostraram uma boa capacidade de distinção entre a espécie convencional e transgênicos apresentando uma taxa de classificação correta de 100% a um nível de confiança de 95%.

**Palavras-chave:** Metodologias Alternativas. Algodoeiro. Quimiometria.

## ABSTRACT

Transgenic is any organism whose genetic material has undergone some change in structure from the recombinant DNA technique (BECHANE, 2012) and are employed in order to obtain certain characteristics such as increased productivity, decreased use of herbicides. In cotton growing, these techniques are used to solve some problems such as pest resistance. Thus arose the need to control transgenic crops to avoid contamination of conventional crops (CIB, 2018). Therefore, it is necessary to detect, identify transgenic events. Some conventional methods are laborious, expensive, time consuming and do not preserve samples. Thus the objective of this work is to develop an alternative methodology based on NIR spectroscopy, for the identification and distinction of conventional and transgenic cotton seeds, which occurs quickly, inexpensively, non-destructively. Thus were obtained 20 cotton seed samples, 10 conventional and 10 transgenic, provided by EMBRAPA Cotton located in Campina Grande - PB. The NIR spectra of all samples were recorded and an exploratory analysis of the data was performed. From the Principal Component Analysis (PCA) technique, it was possible to observe a tendency of separation between the classes, and thus was able to choose the best pre-processing to be used in the development of supervised pattern recognition models, SIMCA. Both PCA and SIMCA showed good distinction between conventional and transgenic species with a correct classification rate of 100% at a confidence level of 95%.

**Keywords:** Alternative Methodologies. Cotton. Chemometrics.

## 1. INTRODUÇÃO

Não é de hoje que os homens vêm exercendo a prática do melhoramento vegetal, desde os tempos mais remotos os mesmos buscavam selecionar os tipos de plantas que melhor se adaptavam às suas necessidades. Esta foi uma forma de domesticação das plantas e uma maneira revolucionária para a obtenção dos alimentos (BORÉM & MILACH, 2010).

Ao longo do tempo esse melhoramento vegetal ficou cada vez mais controlado por causa de alguns estudos, como por exemplo o de Mendel que deu início a uma nova área da ciência a genética (CARRER, BARBOSA, RAMIRO, 2010), Karl Ereky utilizou o termo biotecnologia para se referir a todas as linhas de trabalho cujos produtos eram produzidos a partir de matéria bruta com o auxílio de organismos vivos (STEINBERG, 2002), James Watson e Francis Crick descobriram a dupla hélice do DNA, e o desenvolvimento mais acelerado neste campo de conhecimento só se deu com Stanley Cohen e Herbert Boyer, com o avanço da engenharia genética, cuja informação permitia a alteração direta do material genético do DNA/RNA (GIEHL, 2006; VIEIRA, 2006).

Nos últimos anos a produção de transgênicos se expandiu praticamente em todas as regiões agrícolas do planeta (JAMES, 2013). Thieman e Palladino, 2004, citam que a manipulação genética pode ser a solução para evitar cenários de fome, os alimentos podem ser mais nutritivos, mais resistentes a pragas e de maior adaptação em locais mais pobres em nutrientes.

No Brasil uma cultura que teve grande crescimento de área para plantio foi o algodão, devido à alta demanda do mercado interno e externo, aumento da demanda doméstica e global de proteína para alimentação humana e animal (ABAPA, 2018).

Uma problemática envolvendo os algodoeiros são os danos causados por insetos e pragas, deste modo as mudanças feitas no algodão é de suma importância e essa melhoria está sendo feita utilizando principalmente tecnologias transgênicas (BAOHANG, 2019), onde pode-se obter uma nova variedade com maior teor de proteínas e óleos das sementes (WILKINS, 2000), recuperar variedades mais férteis e resistentes a insetos (BOLEK et al, 2005).

Com o crescimento de aprovações para o plantio dos transgênicos se dando de forma tão rápida, para que seja liberado para comercialização o mesmo deve

passar por rigorosos testes (BRASIL, 2005), então se faz necessário o monitoramento, identificação, detecção da presença de organismos geneticamente modificados (OGMs) em culturas agrícolas e em produtos derivados (SMALL, 2006).

Geralmente alguns modos convencionais de detecção dos transgênicos são métodos caros, onerosos, destroem as amostras (PETIT et al., 2003). Dessa forma surgiu a necessidade de metodologias diferenciadas que tenham maior sensibilidade, confiabilidade, custos mais baixos, com certa rapidez quando comparadas aos métodos convencionais. Dentre esses novos métodos vem se destacando a espectrometria no infravermelho próximo (NIR) (OBEID et al, 2004).

A espectroscopia NIR se torna uma ferramenta alternativa útil para a identificação de transgênicos, pois possui como características ser um método que não necessitar da preparação da amostra, o tempo e o custo de análise são reduzidos, pode ter a caracterização simultânea de múltiplos componentes influenciados pelo genótipo, viabilidade de se fazer a análise online, é uma técnica não destrutiva e não invasiva (HAI-FENG et al, 2012).

O NIR apresenta algumas desvantagens, como ter espectros complexos e não são de interpretação direta. Além do mais, tem a exigência de se ter pessoas com experiência para aplicar as ferramentas matemáticas avançadas no desenvolvimento de modelos de calibração (MAGALHÃES, 2014). Algumas das desvantagens enumeradas são ultrapassadas, com a utilização de técnicas quimiométricas (PEREIRA, 2011).

Neste trabalho está sendo utilizado o reconhecimento de padrões que é uma das linhas de atuação da análise multivariada de dados, onde no mesmo pode obter modelos matemáticos que sejam capazes de reconhecer ou classificar amostras (IQBAL, SUN, ALLEN, 2014). Pode ser uma técnica não-supervisionada ou supervisionada, como por exemplo, a Análise de Componentes Principais (PCA), e a modelagem independente flexível por analogia de classes (SIMCA), respectivamente. A escolha de qual técnica deve ser utilizada dependerá das informações disponíveis e do objetivo pretendido (GREDILLA et al, 2013).

Portanto, diante de tudo que foi exposto o presente trabalho visa desenvolver uma metodologia simples e precisa capaz de distinguir os genótipos convencionais e transgênicos do algodoeiro utilizando espectroscopia NIR, aliada a métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões como o SIMCA (Soft Independent Modeling Class Analogy).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver uma metodologia baseada na espectroscopia NIR e métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões, capazes de distinguir entre genótipos convencionais e geneticamente modificados de algodão.

### **2.2 Objetivo Específico**

- Registrar os espectros dos genótipos convencionais e geneticamente modificados de algodões utilizando o NIR;
- Verificar qual o melhor pré-tratamento espectral;
- Identificar quais as variáveis espectrais estão relacionadas com a modificação genética.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Organismo Geneticamente Modificados

A genética se firmou como uma nova ciência a partir dos experimentos de Mendel, em 1865. Por volta de 1953 ocorreu o descobrimento da dupla hélice do DNA por James Watson e Francis Crick (CARRER, BARBOSA, RAMIRO, 2010), que contribuíram para os avanços da biotecnologia. O desenvolvimento mais acelerado neste campo de conhecimento só se deu a partir de 1973 por Stanley Cohen e Herbert Boyer, com o desenvolvimento da engenharia genética, cuja informação permitia a alteração direta do material genético do DNA/RNA (GIEHL, 2006; VIEIRA, 2006).

O termo biotecnologia em si foi originalmente utilizado pelo húngaro Karl Ereky, em 1919, para se referir a todas as linhas de trabalho cujos produtos eram produzidos a partir de matéria bruta com o auxílio de organismos vivos (STEINBERG, 2002). Nos dias de hoje muitos pesquisadores utilizam a biotecnologia para atender a determinadas demandas, onde o conhecimento desta área da ciência permite a aquisição de plantas geneticamente modificadas de maneira mais controlada (BORÉM, 2005).

Assim é dito que Organismo Geneticamente Modificado (OGMs) são organismos vivos, que podem ser plantas, animais ou microorganismos, cujo material genético foi alterado por meio da engenharia genética (TOZZINI, 2004). Popularmente Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) são conhecidos como transgênicos, esses termos são utilizados como sinônimos, no entanto alguns autores consideram como transgênicos todo organismo cujo material genético sofreu alteração em sua estrutura a partir da técnica do DNA recombinante, com a introdução de fragmentos genéticos de um organismo de espécie diferente na espécie destinatária. Deste modo os transgênicos podem ser considerados OGM, mas os OGM não são obrigatoriamente considerados transgênicos (BECHANE, 2012).

Nos últimos anos a produção de transgênicos se expandiu praticamente em todas as regiões agrícolas do planeta (JAMES, 2013), isso faz com que a transgenia seja a tecnologia agrícola de adoção mais rápida na história da agricultura moderna.

(ISAAA, 2018). Quando o assunto é plantação de algodão, em relação ao Brasil a área destinada ao cultivo de algodão transgênicos aumentou significativamente em 2017. Algumas das razões para esse crescimento foram a rentabilidade, preços favoráveis, alta demanda do mercado interno e externo, disponibilidade das sementes e o aumento das áreas de plantio. Os fatores que podem influenciar a expansão futura desses cultivos de OGMs incluem aumento da demanda doméstica e global de proteína para alimentação humana e animal, necessidade da produção de biocombustíveis e aquecimento do mercado de algodão (ISAAA,2018).

O papel do algodoeiro foi fundamental na história da economia mundial, permanecendo até a atualidade. O algodoeiro é cultivado em mais de 100 países, em todos os continentes, equivalendo a 2,8% das terras aráveis do globo. A cultura do algodoeiro é explorada por grandes e pequenos agricultores, exercendo grande importância em termos econômicos, sociais e produtivos (ABAPA, 2018).

A matéria prima obtida diretamente do algodoeiro são os fios e tecidos. No entanto o algodão é muito versátil e suas subpartes também possuem valor comercial. O óleo do caroço do algodão é o segundo óleo de semente mais importante a nível global, que é utilizado para fins culinários. O resíduo do bagaço da produção de óleo é uma ração rica em proteína, servindo para alimentar gado ruminante (SINGH,2018).

Algumas pragas causam danos ao algodoeiro, a principal praga é o bicudo (*Anthrenus grandis*), um coleóptero que induz a abscisão de estruturas reprodutivas ao se alimentar ou ovopositar em botões florais. Outra praga importante é o pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*), vetor do Cotton Leaf Roll D, art Virus, que transmite um vírus capaz de causar grandes prejuízos em cultivares susceptíveis à doença azul (RICHETTI,2006), os danos causados por essas pragas acabam reduzindo a produtividade, diminuindo o lucro das plantações, entre outros danos e para combater algumas dessas pragas, muitos produtores utilizam um elevado volume de inseticidas resultando em impactos ambientais negativos.

. Mas com o avanço das técnicas transgênicas no meio agrícola, e com o surgimento de variedades de algodão transgênico tolerantes a herbicidas e as pragas, essas técnicas constituem ferramentas importantes para o manejo da cultura. Elas podem ser introduzidas nos diferentes sistemas de produção, reduzindo os prejuízos causados pelas pragas. O benefício da inserção de cultivares transgênicas tolerantes a herbicidas ou resistentes a insetos ocorre por causa da



redução de perdas, de custos com manejo e da quantidade de inseticidas lançados nas lavouras.

### 3.1.1 Vantagens e Desvantagens dos OGMs

As culturas transgênicas oferecem algumas promessas drâmáticas para soluções de alguns problemas como adaptação de alguma cultivar em ambientes com climas extremos, como toda tecnologia nova, a mesma pode apresentar certos riscos, principalmente quando se trata de OGMs que podem reunir combinações de genes que não são encontrados na natureza, dessa forma se torna um organismo questionável quanto ao seu uso (KUMAR et al, 2014).

Alguns defensores dos transgênicos afirmam que os alimentos são tão seguros quanto outros alimentos. Eles acreditam que os reguladores e o processo regulatório são suficientemente objetivos e rigorosos, confiam que a tecnologia dos OGMs é a chave para alimentar uma crescente população mundial, e veem essa tecnologia como uma continuação da manipulação de plantas que os humanos conduziram por milênios. Sendo a diferença entre o melhoramento genético convencional e o transgênico, que esta requer algumas ressalvas laboratórias e uma avaliação rigorosa das plantas transgênicas e do risco potencial que elas representam (KUMAR et al, 2014).

A maioria dos OGMs tem como características serem tolerantes a herbicidas ou resistentes a vírus, fungos ou insetos, características estas que permitem a obtenção de variedades mais robustas, de maior qualidade e rendimento (MARIOTTI *et al.*, 2002; KLUMPER e QUAIM, 2014; RIBEIRO et al, 2017). Também trazem benefícios como à diminuição da quantidade de defensivos que é utilizado para controle de pragas, houve uma redução de 32% na dosagem desses defensivos aplicados para o algodão, isso reflete a quantidade de ingrediente ativo (defensivos químicos) aplicado nas lavouras que também diminuiu (CIB, 2018).

A inclusão de novos traços acaba oferecendo maior produtividade agrícola, ou melhor qualidade e características nutricionais e de processamento, que podem contribuir diretamente para melhorar a saúde e o meio ambiente, pois pode haver benefícios indiretos, como a redução do uso de agrotóxicos, a melhoria da renda agrícola, entre outros (HASLBERGER; LEKOAPE, 2005).

### *3.1.2 Metodologias convencionais para confirmação dos OGMs*

Com a rápida adoção dos Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) e com o crescimento de aprovações para o plantio ambas se dando na mesma velocidade, para que um organismo transgênico seja liberado para comercialização o mesmo deve passar por rigorosos testes (BRASIL, 2005), para isso mais de 120 instituições públicas e privadas foram credenciadas junto aos órgãos reguladores, para desenvolver pesquisas referentes aos OGMs, e nesses últimos 20 anos de uso de alimentos transgênicos em larga escala, não foram registrados nenhum impacto negativo no meio ambiente ou na saúde humana e animal (EMBRAPA, 2017).

Sabendo que a simples detecção desses organismos não garantem a segurança dos alimentos produzidos com OGMs, mas essa detecção se faz necessária, pois permite verificar algum tipo de contaminação em diversos cultivos expostos a riscos biológicos e com implicações econômicas, sociais e ambientais, também se faz necessários para que o consumidor tenha informações adequadas sobre os produtos que estão adquirindo, e para gerarem confiança nesses alimentos (CONCEIÇÃO; MOREIRA; BINSFELD, 2006).

Geralmente alguns modos de detecção dos OGMs são caracterizados pela presença de um ou mais segmentos de DNA exógenos, podendo ou não acomodar a expressão de novas proteínas. Sendo assim, a detecção destes organismos é baseada na sequência do DNA exógeno ou na proteína transgênica. Em se tratando de produtos alimentícios contendo OGMs tem-se uma análise de rotina que é realizada em três etapas, a detecção, a identificação do OGM presente na amostra, para verificar se tem autorização para comercialização e pôr fim a quantificação do OGM no produto com a finalidade de rotulagem ou não, conforme a legislação (PETIT et al., 2003).

Alguns métodos de detecção são baseados na presença de proteínas como os bioensaios e os imunoenaios. Geralmente os OGMs utilizados na alimentação são tolerantes a herbicidas ou resistentes a insetos, fungos ou vírus (MARIOTTI, 2002), os quais podem ser analisados por bioensaios, onde detectam a presença do herbicida, no geral são métodos simples e práticos, neles as sementes são colocadas para germinar em um meio contendo uma solução diluída de herbicida, se a semente for resistente ao herbicida glifosato, ocorrerá a germinação da plântula. Esse bioensaio tem algumas limitações como a necessidade de um longo tempo

para a obtenção dos resultados e a utilização restrita à OGMs resistentes à herbicidas (TORRES et al., 2003).

Segundo Stave (1999), os imunoenaios são ideais para a detecção qualitativa e quantitativa de proteínas em misturas complexas. É baseado na concentração típica de proteínas transgênicas em tecidos vegetais ( $> 10\mu\text{g. g}^{-1}$  de tecido). O limite de detecção de um imunoenasão é de aproximadamente 1%, no entanto, nem sempre é possível a detecção de OGMs por este método. Dentre os métodos de imunoenaios pode-se destacar o ensaio imunoenzimático (ELISA), o imunoenasão de fluxo lateral (IFL) e o Western blot, que são bastantes utilizados na detecção e quantificação de alimentos contendo OGMs (MAGIN, 2000).

Existem também métodos de detecção baseados na presença de DNA, já que geralmente pode-se estabelecer uma correlação linear entre a quantidade de OGM e DNA exógeno quando a modificação genética é nuclear. No entanto, em se tratando de modificação genética não nuclear, como é o caso de quando o DNA exógeno é introduzido em uma organela como o cloroplasto, essa correlação não é possível. Até o momento, todos os OGMs comercializados possuem modificação genética nuclear (CONCEIÇÃO et al., 2004).

Por ser mais estável que a maioria das proteínas, o DNA é passível de ser detectado em alimentos processados, e o principal método utilizado na detecção e quantificação de alimentos contendo OGMs é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA. Este método é sensível, específico, seguro, capaz de detectar uma ampla série de eventos (BERTHEAU et al., 2002; GIOVANNINI, CONCILLO, 2002), e distinguir as variedades GM que apresentam diferentes construções gênicas, porém expressam a mesma proteína (YAMAGUCHI et al., 2003).

As principais limitações do PCR são as dificuldades na construção dos indicadores, pois suas informações sobre a sequência da modificação genética geralmente são confidenciais (HOLST-JENSEN et al., 2003), necessidade de pessoal treinado e de equipamentos especiais, custo elevado, já que cada teste é específico para uma única modificação genética, necessitando também de material de referência certificado, cuja disponibilidade geralmente é limitada (MIRAGLIA et al., 2004).

### 3.1.3 Metodologias Alternativas para confirmação dos OGMs

Outras formas de detecção e quantificação de OGMs vem sendo desenvolvidos, as novas metodologias têm maior sensibilidade, confiabilidade, custos mais baixos, com certa rapidez quando comparadas aos métodos convencionais. Dentre esses novos métodos vem se destacando a cromatografia, a espectrometria de massa, a espectrometria no infravermelho próximo, a eletroforese capilar este último consegue identificar o promotor 35S (OBEID et al., 2004).

Discorrendo melhor sobre a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), a mesma pode ser empregada na detecção e quantificação de OGMs, pois é baseada na mensuração do comprimento e na intensidade de absorção de luz infravermelha próximo realizada pela amostra. Como vantagens essa técnica é rápida, não requer a destruição da amostra, mesmo diante dessas vantagens, a quantificação ainda precisa ser validada (HURBURGH, et al., 2000; KOK et al., 2002).

As bandas no infravermelho próximo são muito mais fracas que as vibrações fundamentais no infravermelho médio. Esta natureza fraca da absorção de NIR é uma vantagem analítica visto que permite uma análise direta de matrizes com absorções fortes com alta dispersão de luz, tais como lamas, suspensões, pastas e pós. As bandas de absorção de NIR são amplas e muito sobrepostas. Quando os comprimentos de onda são longos, as bandas são fortes, nítidas e com melhores resoluções (ARNOLD, HARVEY, 2002).

Os espectros NIR, tanto contém informação sobre a composição química da amostra, como também relacionam a sua informação física. A região espectral ideal para ser usada para a análise de uma amostra é determinada pela correspondência entre as propriedades espectrais da região NIR com a performance analítica requerida, as requisições de amostragem e as propriedades físicas da amostra (METROHM, 2013).

Quando trata-se da lógica por trás da análise transgênica utilizando o NIR primeiro tem a característica da absorção espectral de ligações moleculares, tais como C-H, C-N, O-H e S-H, que está relacionada às mudanças fenotípicas (nível de expressão) causadas por mudanças genotípicas. Alguns métodos quimiométricos são usados para extrair informações detalhadas sobre os genótipos das amostras. Assim a espectroscopia NIR torna-se uma ferramenta alternativa útil para a

identificação de transgênicos, pois possui como características ser um método que não necessita da preparação da amostra, o tempo e o custo de análise são reduzidos, pode ter a caracterização simultânea de múltiplos componentes influenciados pelo genótipo, viabilidade de se fazer a análise online, é uma técnica não destrutiva e não invasiva (HAI-FENG et al, 2012).

O NIR apresenta algumas desvantagens, como ter espectros complexos e não são de interpretação direta. Isto deve-se ao fato de as bandas de absorção serem geralmente sobrepostas e podendo aparecer não-específicas e mal-entendidas, ou seja, necessitando de um pré-processamento para que as diferenças espectrais sejam sobressaídas, assim à primeira vista pode não ser possível detectar. Além do mais, tem a exigência de se ter pessoas com experiência para aplicar as ferramentas matemáticas avançadas no desenvolvimento de modelos de calibração (MAGALHÃES, 2014). Algumas das desvantagens enumeradas são ultrapassadas, com a utilização de técnicas quimiométricas (PEREIRA, 2011).

### **3.2 Reconhecimento de Padrões**

O reconhecimento de padrões é utilizado visando a obtenção de modelos matemáticos que sejam capazes de reconhecer ou classificar amostras (IQBAL et al., 2014). Podendo ser supervisionada ou não supervisionada. A escolha de qual deve ser utilizada irá depender das informações disponíveis e do objetivo pretendido (GREDILLA et al., 2013). Nas técnicas supervisionadas deve existir um conhecimento prévio sobre a identidade das amostras, para que seja possível a classificação (YI et al., 2013). Já nas técnicas não supervisionadas não é exigido o conhecimento prévio sobre a identidade das amostras.

#### *3.2.1 Análise de Componentes Principais (PCA)*

A PCA faz parte das técnicas de reconhecimento de padrões não supervisionados, cujo princípio é manipular matematicamente um conjunto de dados de natureza multivariada, a mesma é capaz de identificar similaridades e diferenças entre amostras do conjunto de dados, tendo assim a redução da dimensionalidade das variáveis e representação das variações existentes na forma de componentes principais (PCs), (HUANG et al, 2015). PCA é provavelmente a técnica que possui

uma maior aceitação pela comunidade científica e é largamente utilizada em diversas aplicações (BRERETON, 2003).

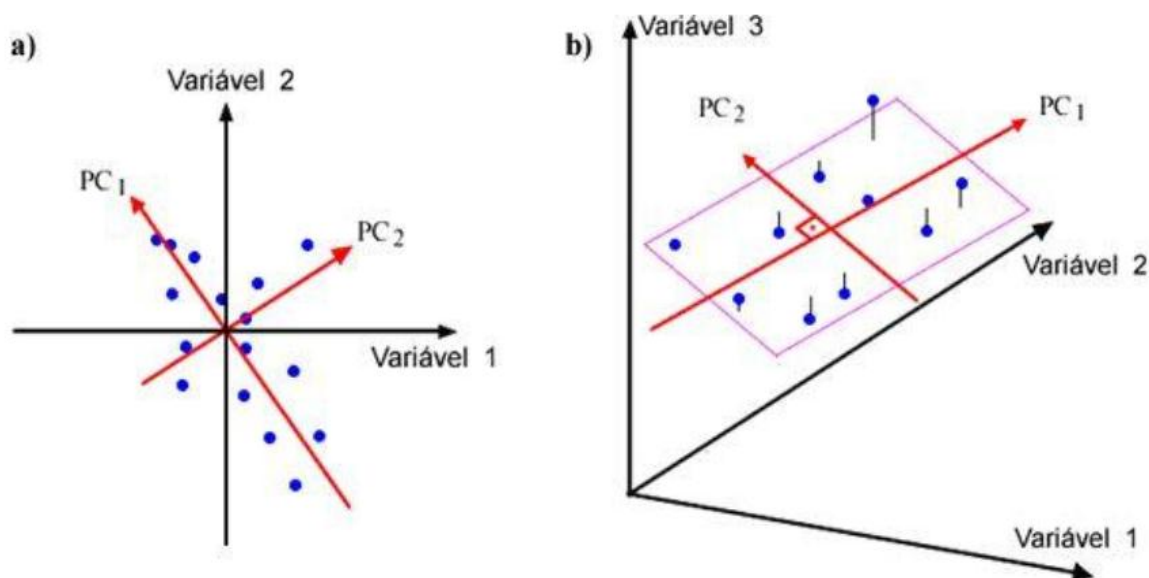
O modelo que representa a transformação da matriz de dados em um modelo bilinear obedece a equação exposta abaixo:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TL}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

Onde na PCA ocorre à decomposição da matriz  $\mathbf{X}$  em um produto de duas matrizes,  $\mathbf{T}$  é a matriz de scores (são as coordenadas das amostras no novo sistema de eixo) e  $\mathbf{L}$  a matriz dos pesos (Loadings, que são os cossenos dos ângulos entre os eixos originais e as componentes principais) e  $\mathbf{E}$  é a matriz dos erros.

O novo modelo que é formado a partir de uma combinação linear das variáveis originais e nelas contidas estão as informações mais relevantes dos dados, assim as representações dos novos eixos formados são denominados de componentes principais (PC do inglês *Principal Component*), onde serão sempre ortogonais (perpendiculares) umas às outras e representarão, de forma decrescente, a maior variância dos dados (BORRÁS et al., 2014).

**Figura 1:** Análise de componentes principais (PCA) – primeira e segunda PCs no espaço tridimensional das variáveis.



Fonte: HUANG et al., 2015

Nos resultados mostrados na PCA tem as imagens dos scores que podem fornecer informações importantes sobre o conjunto de dados, principalmente quando combinados aos gráficos de pesos. Também é possível obter um gráfico de dispersão com a matriz desdobrada de uma imagem de escores de uma

componente versus outra. Este tipo de gráfico pode fornecer informações sobre *outliers* e diferentes classes no conjunto de dados analisados, (GELADI et al., 1989).

PCA é uma técnica bastante utilizada como base para outras técnicas quimiométricas multivariadas como, por exemplo, o SIMCA, que é uma técnica de reconhecimento de padrão supervisionado.

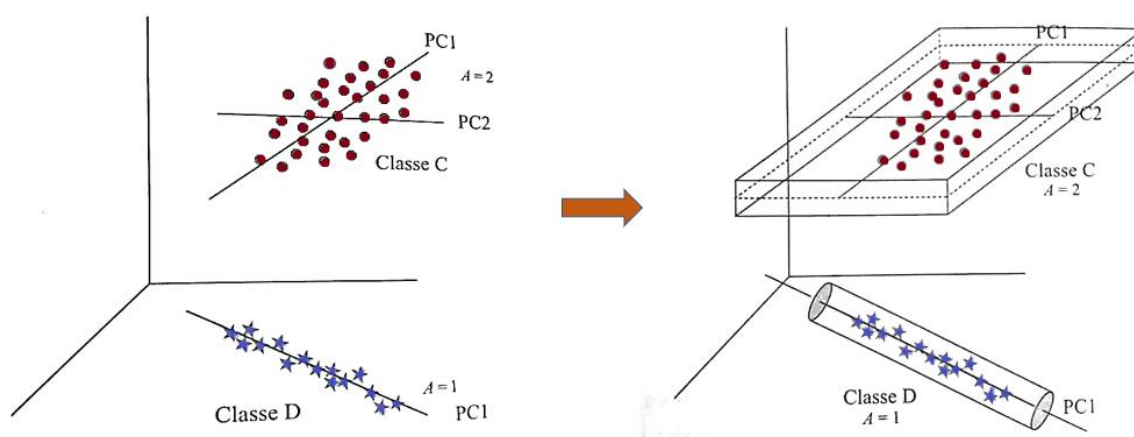
### 3.1.2 SIMCA

Esse método foi introduzido por Svante Wold nos anos 1970. Como a Quimiometria teve seu início na área de reconhecimento de padrões, SIMCA foi o nome do primeiro pacote computacional, por esse motivo a palavra SIMCA era considerada sinônimo de Quimiometria (FERREIRA, 2015).

A modelagem independente flexível por analogia de classes, vem do inglês Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA) é a principal técnica para o desenvolvimento de modelos supervisionados que modela a localização das classes no espaço multimensional pelo cálculo de componentes principais PCs separadamente para cada categoria (BRERETON, 2003).

Esse método assume que os valores medidos para um grupo de amostras parecidas tenderão para uma distribuição uniforme e modelável, assim uma amostra desconhecida pode ser classificada como pertencente a uma, a mais de uma ou a nenhuma categoria predefinidas, dessa forma o SIMCA faz um tipo de embalagem para cada classe.

**Figura 2:** – Processo de Modelagem do SIMCA



**Fonte:** FERREIRA, 2015.

No SIMCA um modelo de componentes principais é ajustado a cada classe do conjunto de treinamento, dando origem a um classificador para cada classe de forma independente, o que evita a influência de uma sobre as outras no processo de definição das classes, essa é uma das grandes vantagens desse método, a outra vantagem é que o SIMCA é capaz de detectar *outliers*, o que significa que essa técnica é capaz de identificar amostras que não pertencem a quaisquer das classes determinadas.

Tem que ser tomados os seguintes passos no SIMCA (BERRUETA et al., 2007):

- (i) Precisa fazer uma seleção das amostras para pertencerem ao conjunto de treinamento, de validação e de teste, que consistem de objetos de associação de classes conhecidas para as quais as variáveis são medidas;
- (ii) Uma seleção das variáveis é feita para eliminar aquelas que correspondem a ruído ou que não tenham poder discriminante;
- (iii) Constrói um modelo utilizando o conjunto de treinamento, gerando algumas categorias que se agrupam de acordo com as suas semelhanças;
- (iv) Faz uma validação do modelo utilizando um conjunto independentes de amostras para avaliar a consistência da classificação.

Existe o fator do número de PCs, onde não deve ser muito alto, pois existe um risco de fazer um modelo baseado em ruído ou em dados aleatórios, e nem muito baixo, já que pode deixar de incluir dados importantes, diminuindo o poder exploratório do conjunto de dados. (BERRUETA et al., 2007).

O ideal para a obtenção de um modelo satisfatório é o fato das amostras serem independentes tanto para o grupo de treinamento quanto para a validação, se isso não for satisfeito e não se tenham amostras suficientes para tal coisa, faz uma validação cruzada interna, onde o próprio conjunto de dados é dividido em dois subconjuntos: treinamento e validação (ALMEIDA et al., 2013).

Essa validação cruzada interna tem a característica de deixar de fora um segmento e fazer o modelo com o restante desses segmentos, constituindo o conjunto de treinamento, para validar só pegar o segmento que foi deixado de fora. Esse procedimento é repetido várias vezes. Assim ao final da validação cruzada, haverá não apenas um modelo, mas um grupo de modelos que descrevem o conjunto de dados (ENKILDE, JACOBSEIN, SONDERGAARD, 2007).



## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Local do experimento**

Este trabalho foi realizado no Laboratório Avançado de Tecnologia Química (LATECQ) localizada na Embrapa Algodão, em Campina Grande, PB.

### **4.2 Amostras convencional e transgênica**

As amostras das sementes de cultivares de algodões transgênicos e convencionais foram cedidos pela Embrapa Algodão localizada na cidade de Campina Grande-PB, sendo uma espécie de algodão geneticamente modificada denominada (BRS 368 RF) e uma espécie de algodão convencional denominada (BRS Aroeira), foram adquiridas 10 amostras de cada uma delas totalizando uma quantidade de 20 amostras. Após a coleta das amostras na forma de plumas de algodão contendo a semente, foi realizada a limpeza da semente de forma a deixar a semente sem resíduo de fibra.

A cultivar geneticamente modificada, BRS 368 RF, utilizada neste trabalho foi originada de um cruzamento biparental, realizado pela Embrapa Algodão, obtido a partir de um programa de melhoramento de retrocruzamento para incorporação do evento comercial MON 88913 que é conhecido como Roundup Ready® Flex (RF) para conferir resistência ao herbicida glifosato em germoplasma de algodão. Esse cruzamento se deu com a cultivar convencional BRS 286, proveniente da Embrapa, que foi utilizada como pai recorrente e a cultivar de algodão de alto rendimento Sure Grow 125 utilizada como doadora de características, proveniente da Monsanto (BOWMAN et al, 2006; BARROSO et al., 2017).

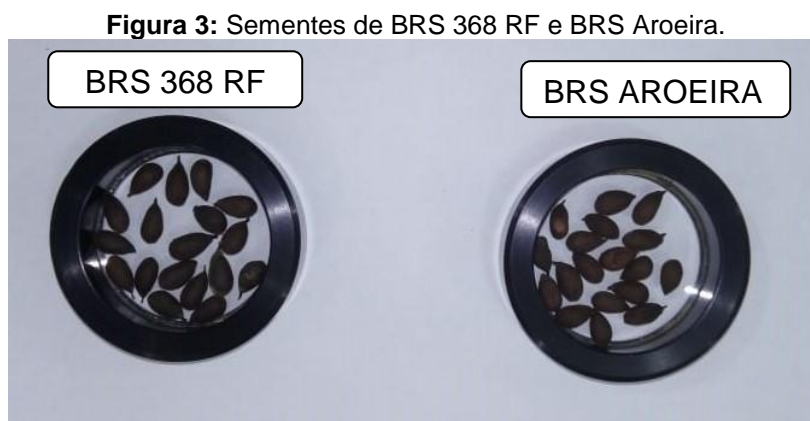
A cultivar BRS 286 tem como características boa qualidade de fibra, precocidade, adaptação ao cerrado nordestino, possui níveis adequados de resistência às principais doenças, sendo resistente à mancha angular, mosaico da nervura, mosaico comum, entre outros. Já o Sure Grow 125 RF é susceptível à doença do algodão azul, causada pelo vírus anão do algodoeiro Leafroll e não tem boa qualidade de fibra (BARROSO, 2017).

A cultivar transgênica (BRS 368 RF) tem como características ser de porte baixo, tem o ciclo de médio a precoce, com rendimento de fibra de 40% e potencial

produtivo entre 4.200 e 4.500 kg/ha e é resistente ao herbicida glifosato, por esse motivo, a mesma oferece maior flexibilidade no controle de plantas daninhas, permitindo a aplicação em qualquer fase do desenvolvimento da cultura sem necessidade de pulverizações com herbicidas não seletivos em jato dirigido (EMBRAPA, 2017).

Já a cultivar convencional (BRS Aroeira), produz em média 3841 kg/ha, dentre as cultivares plantadas no Brasil, esta é a que dispõe de maior teor de óleo na semente (25% a 27%) comparada com as outras que possuem em média 14% de óleo, possui fibras mais finas, com maior comprimento, representam uma alternativa para a produção de custo baixo e possui resistência múltipla a doenças como ramulose, viroses, mancha de stemphylium, além de tolerância a bacteriose, manchas de ramularia, entre outros (FREIRE, 2002).

O aspecto das duas cultivares, convencional e transgênica são semelhantes, sendo impossível distingui-las visualmente, como mostra a Figura 3.



**Fonte:** Própria, 2019.

## 4.3 Instrumentação

### 4.3.1 Espectroscopia NIR

As medidas espectrais de reflectância difusa na região do visível e infravermelho próximo foram adquiridas por meio do espectrômetro VIS/NIR modelo XDS Analyser (Foss Analytical, Hogans, Sweden) como ilustrado na Figura 4.

**Figura 4:** Espectrofotômetro XDS near-infrared Rapid Content TM Analyser da FOSS Analytical



**Fonte:** Própria, 2019.

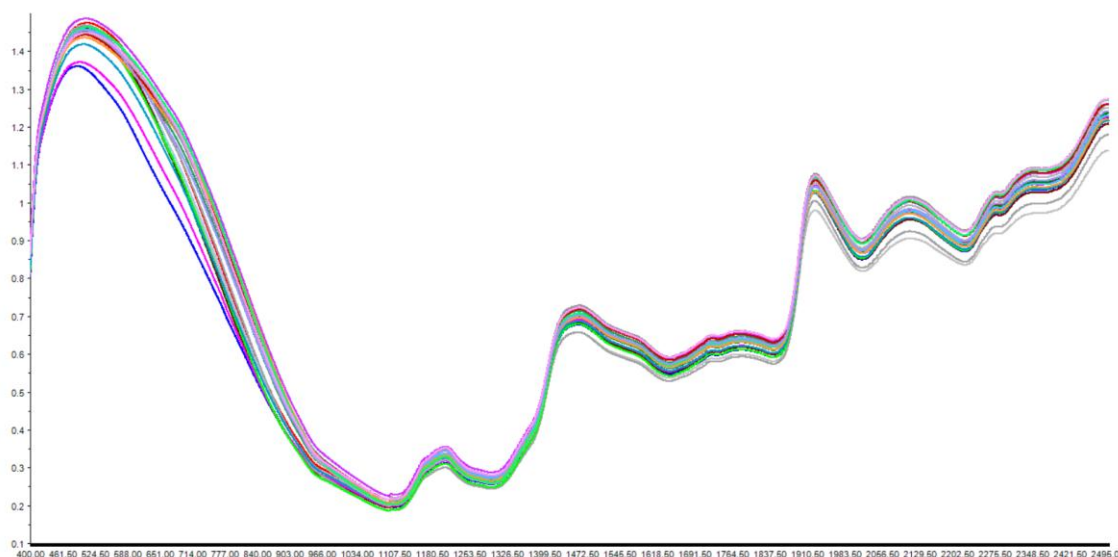
Os espectros foram registrados na região de 400-2500 nm, com resolução de 0,5 nm e 32 scans. Para a análise das sementes por espectroscopia NIR foram utilizadas uma quantidade de sementes que preenchesse o recipiente de amostra do equipamento (em torno de 25 sementes), ressaltando que para uma melhor visualização foi mostrado na figura 3 uma célula que não estava totalmente preenchida.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise Exploratória

A Figura 5 apresenta os espectros brutos das 20 sementes. Pode-se observar que não é possível encontrar visualmente características espectrais que possam diferenciar as amostras transgênicas das convencionais. Também pode-se observar um deslocamento de linha de base e um espalhamento no sinal espectral devido à natureza da amostra.

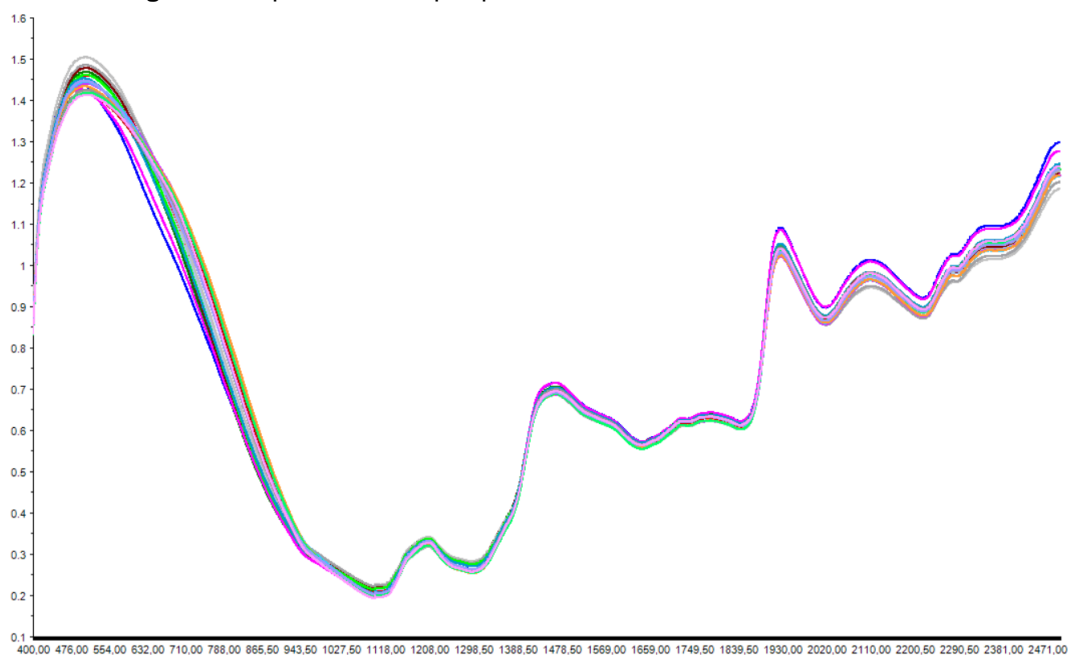
**Figura 5:** Espectro bruto das 20 amostras.



**Fonte:** Software The Unscrambler X

Deste modo, alguns pré-processamentos espectrais foram aplicados a fim de remover estas características físicas relacionadas aos aspectos físicos das amostras. Os pré-processamentos testados foram a Correção Multiplicativa de Espalhamento (MSC: Multiplicative Scattering Correction), Variação Normal Padrão (SNV: Standard Normal Variate) e suavização com janela de 9 pontos e polinômio Savitzky Golay de segunda ordem, onde só será inserido neste trabalho a imagem da figura 6 pertinente aos espectros contendo somente o pré-processamento com MSC.

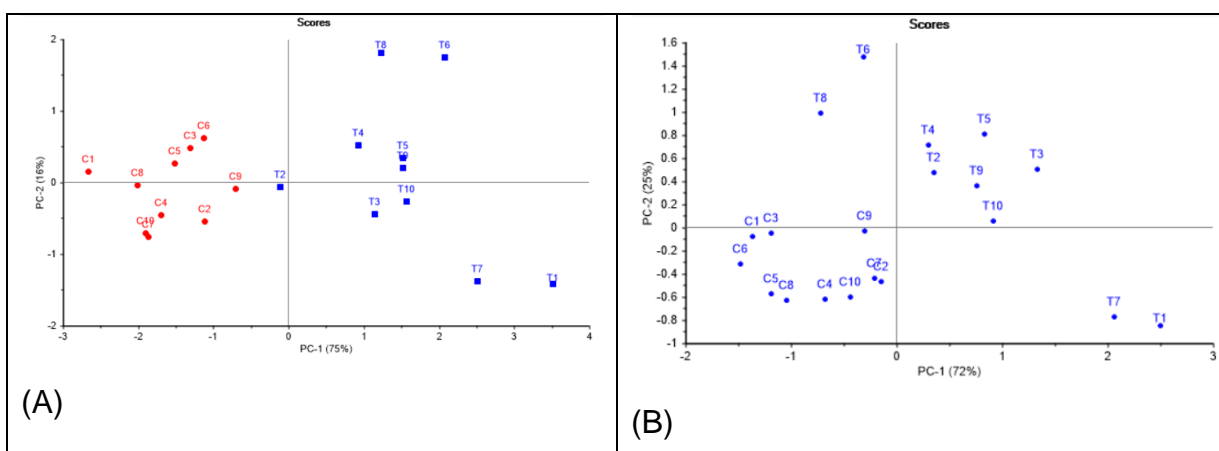
**Figura 6:** Espectro com o pré-processamento MSC das 20 amostras.

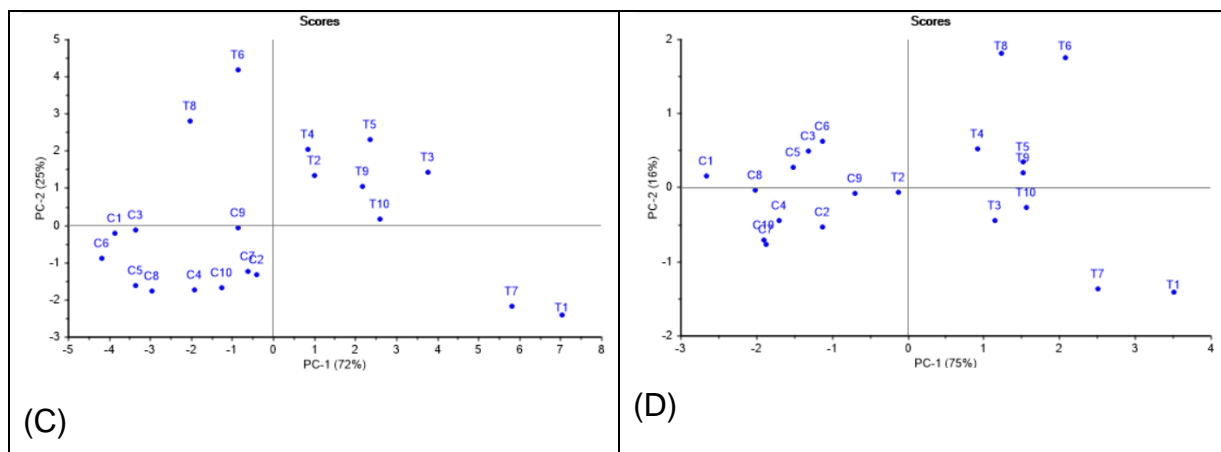


Fonte: Software The Unscrambler X

A análise em componentes principais (PCA) foi aplicada a fim de realizar uma análise exploratória dos dados brutos e pré-processados. Tanto a PCA dos dados brutos quanto dos pré-processados apresentou uma tendência de separação entre as sementes convencionais e transgênicas, como mostra a figura 7.

**Figura 7:** Análise de componentes principais (PCA) referente aos espectros brutos (A) e pré-processados com (B) MSC (C) SNV e (D) Suavização com janela de 9 pontos e polinômio Savitzky Golay de 2ª ordem.





Fonte: Software The Unscrambler X

De modo geral, as amostras transgênicas se localizaram predominantemente nos escores positivos de PC1, enquanto as amostras convencionais se localizaram nos escores negativos de PC1. Também pode-se observar que as amostras convencionais apresentam uma menor variabilidade espectral, apresentando uma menor distância intraclasse. Já as amostras transgênicas apresentam uma maior variabilidade e conseqüentemente uma maior distância intraclasse.

A PCA dos dados brutos não foi utilizada já que na mesma além de conter informações químicas sobre as amostras, contêm também informações físicas, isso acabaria sendo modelado no SIMCA, onde acabaria não sendo um modelo de classificação tão robusto.

Já os dados tratados com MSC foram os que se adequaram melhor às amostras já que além de ser um pré tratamento simples, são amostras sólidas, preserva o espectro original e os dados são mais confiáveis, onde o mesmo retira do conjunto de dados o espalhamento devido as propriedades físicas das amostras. Assim os resultados indicam que os dados em questão fornecerão modelos de reconhecimento de padrões supervisionados com uma boa capacidade preditiva.

## 5.2 Modelos de Reconhecimento de Padrões Supervisionados

Visando o desenvolvimento de uma metodologia alternativa aos métodos convencionais que possa ser utilizada para distinguir sementes convencionais e transgênicas, foram construídos modelos de reconhecimento de padrões supervisionados utilizando o método SIMCA. Levando em conta os resultados da

análise exploratória os modelos SIMCA foram construídos utilizando os dados tratados com MSC. Para a construção dos modelos 6 amostras de cada classe foram utilizadas para a etapa de treinamento e 4 amostras de cada classe na etapa de teste. Deste modo, o conjunto de treinamento foi composto de 12 amostras e o conjunto de teste foi composto por 8 amostras. Visando a representatividade e reprodutibilidade da amostragem, as amostras dos conjuntos de treinamento e teste foram selecionadas com o auxílio do algoritmo Kennard Stone (KENNARD, 1969).

### 5.2.1 Modelo SIMCA

Para a construção do modelo SIMCA, foi feita uma PCA para a classe convencional, contendo seis amostras e uma PCA para a classe transgênica contendo seis amostras, separadamente. Em seguida o modelo SIMCA foi testado com um total de oito amostras, sendo quatro convencionais (amostras 3, 7, 8 e 10) e quatro transgênicas (amostras 4,5, 7 e 9).

Podemos observar na Tabela 1 o resultado da etapa de teste do modelo SIMCA. A mesma mostra a classificação de cada amostra nas classes. Como pode ser observado foi alcançado 100% de classificação correta, a um nível de confiança de 95%, não sendo apresentados resultados falsos positivos ou falsos negativos.

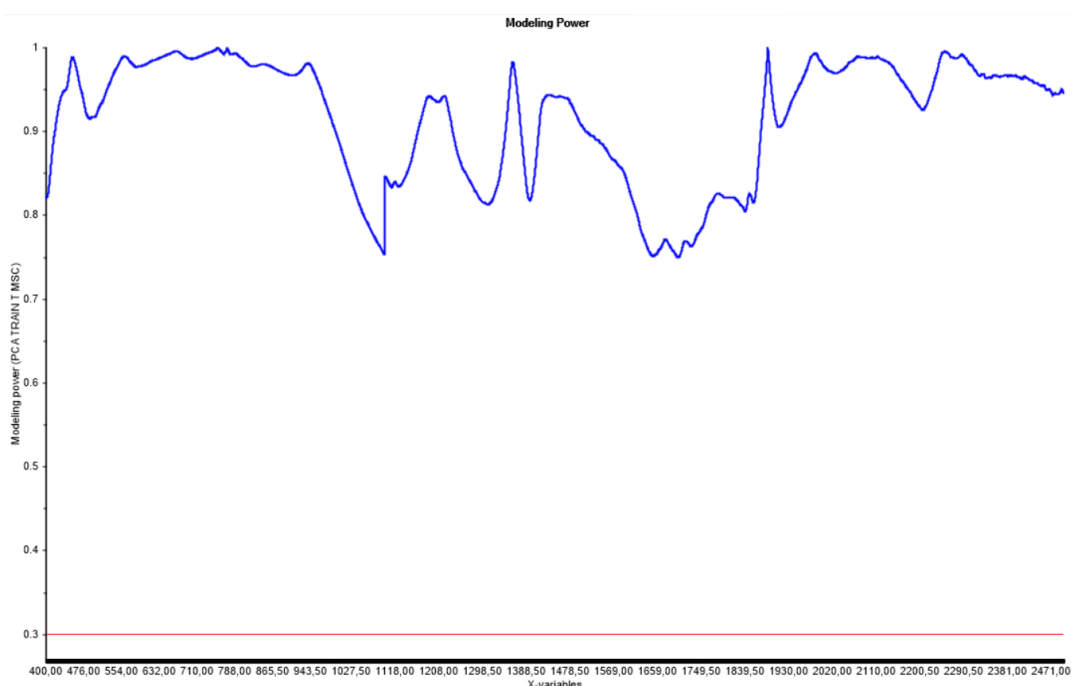
**Tabela 1:** Classificação SIMCA.

Amostra	Classe convencional	Classe Transgênico
Amostra_3 (C)	*	
Amostra_7 (C)	*	
Amostra_8 (C)	*	
Amostra_10(C)	*	
Amostra_4 (T)		*
Amostra_5 (T)		*
Amostra_7 (T)		*
Amostra_9 (T)		*

**Fonte:** Software The Unscrambler X

Para verificar se o modelo é robusto utiliza-se de duas ferramentas o Poder de Modelagem (PM) e o Poder Discriminante (PD) para cada variável espectral. Está sendo mostrado na figura 8 as variáveis que são importantes para o modelo, onde amostras que estão abaixo da limiar 0.3 (linha vermelha) não é importante para o modelo, já amostras que estão acima de 0.3 são importantes para esse modelo. Deste modo todas as amostras utilizadas para fazer o modelo SIMCA foram importantes, pois todas estão acima de 0.7.

**Figura 8:** Poder de Modelagem por variável

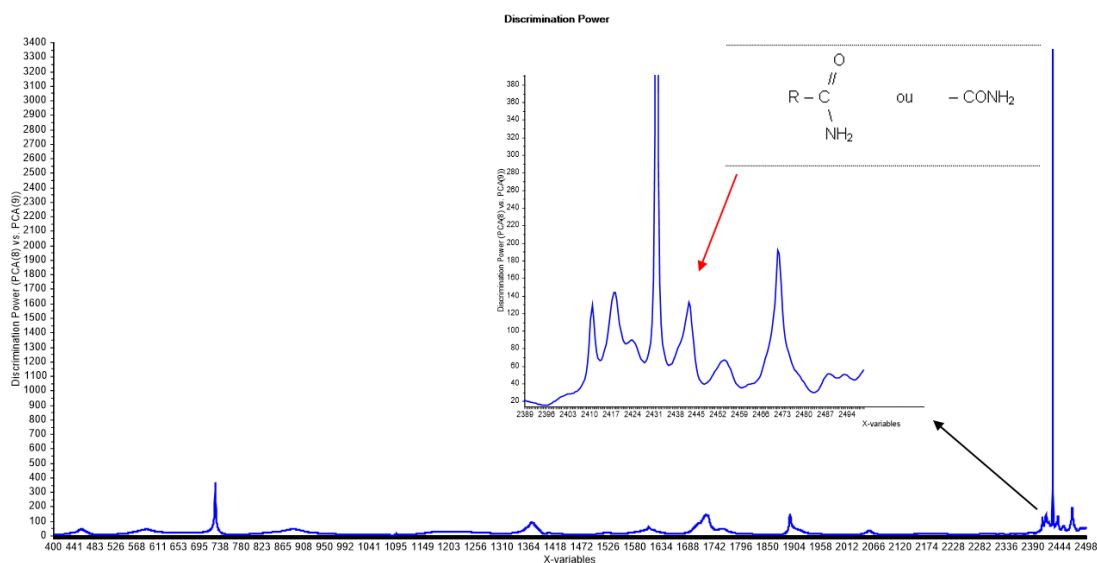


**Fonte:** Software The Unscrambler X

Em relação ao Poder Discriminatório (PD) Figura 9, que mostra o quanto cada variável contribui para a separação dos dois modelos, pode-se observar que a variável no comprimento de onda de aproximadamente 2.432 nm possui um alto valor de PD. O comprimento de onda 2.432 nm pode ser atribuído ao grupo funcional aril (C-H aromático C-H) (WORKMAN, WEYER, 2007).



**Figura 9:** Poder de Discriminação por variável, destaque relacionado a região relacionada a estrutura alfa-hélice do peptídeo.



Fonte: Software The Unscrambler X

A região de 2.400 a 2.493 nm apresenta variáveis com alto valor de PD, dentre as variáveis desta região se encontra o comprimento de onda 2445 nm (seta vermelha) que pode ser atribuído ao grupo funcional  $\text{CONH}_2$ , especialmente devido a ligação hidrogênio  $\text{C}=\text{O}$  com  $\text{N}-\text{H}$  do peptídeo denominada estrutura alfa-hélice (WORKMAN, WEYER, 2007). A  $\alpha$ -hélice está presente na estrutura secundária dos níveis de organização das proteínas e se assemelha a uma escada em espiral. Nesta estrutura o esqueleto de polipeptídeo está estreitamente enrolado ao longo do maior eixo da molécula e os grupos R dos resíduos de aminoácido projetam-se para fora do esqueleto helicoidal. A estabilização se dá pela presença das ligações de hidrogênio entre os grupamentos  $\text{NH}$  e  $\text{CO}$  da cadeia principal. O grupamento  $\text{CO}$  de cada aminoácido forma ponte de hidrogênio com o grupamento  $\text{NH}$  do aminoácido que está situado a quatro unidades adiante na sequência linear, sendo que todos os grupamentos  $\text{NH}$  e  $\text{CO}$  formam pontes de hidrogênio (WORKMAN, WEYER, 2007).

## 6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o método de reconhecimento de padrões não supervisionados, a partir da técnica de Análise de Componentes Principais, realizou uma análise exploratória dos dados onde foi observada uma tendência de separação entre as duas classes de amostras, bem como auxiliou na escolha no melhor pré-processamento a ser utilizado no desenvolvimento dos modelos de reconhecimento de padrões supervisionados. O modelo SIMCA foi desenvolvido com os dados pré-processados utilizando o MSC, já que o mesmo é simples, se adequa melhor aos tipos de amostras sólidas, adequado para medida de refletância, preservando o espectro original, e os dados são mais confiáveis por que ele retira do conjunto de dados o espalhamento devido as propriedades físicas das amostras, garantindo assim que tanto a PCA quanto o SIMCA apresentaram distinção entre as classes a partir das diferenças químicas das amostras e não baseado em propriedades físicas. Dessa forma tanto as técnicas não supervisionadas (PCA) quanto a técnica supervisionada (SIMCA) mostraram um bom desempenho, mostrando distinção entre as duas classes estudadas e uma taxa de classificação correta de 100% a um nível de confiança de 95%.

## REFERÊNCIAS

- ABAPA. **RELATÓRIO DE GESTÃO BIÊNIO**, 2017-2018. Disponível em: <http://abapa.com.br/wp-content/uploads/2019/02/Relat%C3%B3rio-de-Gest%C3%A3o-da-Abapa-Bi%C3%AAnio-2017-2018.pdf> Acesso em: 20 jul. 2019.
- ALMEIDA, M. R.; et al. **Discrimination between authentic and counterfeit banknotes using Raman spectroscopy and PLS-DA with uncertainty estimation.** *Microchemical Journal*, v.109, p.170–177, 2013.
- ARNOLD, S.A; HARVEY, L.M. **Employing Near-Infrared Spectroscopic Methods of Analysis for Fermentation Monitoring and Control - Part 1, Method Development.** BioPharm International, 2002.
- BAOHANG ZHANG (ed), **Transgenic Cotton: Methods and Protocols**, Methods in Molecular Biology, Springer Science + Business Media, part of Springer Nature, vol. 1902, 2019.
- BARROSO, P.A.V; et al. **BRS 368RF: A glyphosate tolerant, midseason upland cotton cultivar for Northeast and North Brazilian cerrado.** *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 17, p. 399-402, 2017
- BECHANE, V. **Organismos geneticamente modificados.** *Jornada Científica*, v. 1, 2012.
- BERRUETA, L.; ALONSO-SALCES, R.; HEBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography*, v.1158, n.1-2, p.196-214, 2007
- BERTHEAU, Y. et al. Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. *Journal of AOAC International*, v.85, p.801-808, 2002
- BOLEK, Y.K.M; EL-ZIK, A.E; PEPPER et al., “Mapping of verticillium wilt resistance genes in cotton”, *Plant Science*, vol. 168, n° 6, p. 1581-1590, 2005.
- BORÉM, A. **A história da Biotecnologia.** In: **BioTecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, 2005. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio34/bio34.pdf#page=10>. Acesso em: 23 Ago 2019.

BORÉM, A; MILACH, S.C.K. **Melhoramento de plantas**, 2010. Disponível em: <http://www.biotechnologia.com.br/revista/bio07/encarte7.pdf>, Acessado em: 22 ago 2018.

BOWMAN, D.T; et al. **Pedigrees of upland and pima cotton cultivars released between 1970 and 2005**. Mississippi Agricultural & Forestry Experiment Station, Starkville, 58p. (Bulletin 1155), 2006

BRASIL, Lei 11.105, 24 de março de 2005. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm). Acesso em: 04 ago 2019.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant** Chichester: John Wiley. *Journal of Chemometrics*, 2003.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. **Biotechnologia na agricultura**. *Estudos Avançados*, v.24, n.70, p.149-164, 2010.

CIB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia, 20 anos de transgênicos: impactos ambientais, econômicos e sociais no Brasil, 2018.

CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N.; BINSFELD, P.C; **Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.1, p.315-324, jan-fev, 2006.

CONCEIÇÃO, F.R. et al. **Detecção de organismos geneticamente modificados**. In: BINSFELD, P.C. *Biossegurança em biotecnologia*. Rio de Janeiro: Interciência. p.145-169, 2004.

EMBRAPA, **Algodão resistente a herbicida será apresentada a produtores cearenses, 2017**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/25276303/algodao-resistente-a-herbicida-sera-apresentado-a-produtores-cearenses>. Acesso em: 05 jul 2019.

ENKILDE, K.; JACOBSEN, S.; SØNDERGAARD, I. **Multivariate data analysis of proteome data**. *Methods in Molecular Biology*, v.355, p.195- 210, 2007.

FERREIRA, M.M.C. **Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.

FREIRE, E.C; Morrelo,C de L; Matos, J.P; Senhorelo, W.L,P. **Desempenho comercial das cultivares BRS Aroeira e BRS Ipê no Estado de Goiás- Safra 2001/2002**, 2002.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. **Partial least-squares regression: a tutorial**. *Analytica Chimica Acta*, v. 185, p. 1–17, 1986

GIEHL, G. **A biotecnologia e segurança dos alimentos transgênicos**. Revista Âmbito Jurídico, v. 23, n. 5, p. 180-189, 2006.

GIOVANNINI, T.; CONCILLO, L. **PCR detection of genetically modified organisms: a review**. *Starch*, v.54, p.321-327, 2002

GREDELLA, A.; et al. **Unsupervised pattern-recognition techniques to investigate metal pollution in estuaries**. *Trends in Analytical Chemistry*, v.46, p.59-69, 2013.

HAI-FENG, C; et al. **Automatic and Rapid Discrimination of Cotton Genotypes by Near Infrared Spectroscopy and Chemometrics**. *Journal of Analytical Methods in Chemistry, China*, 2012.

HASLBERGER, A; LEKOAPE, K. **Modern food biotechnology, human health and development: and evidence-based study**. Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases, World Health Organization. p.32-37, 2005.

HOLST-JENSEN, A. et al. **PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs)**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.375, p.985- 993, 2003.

HUANG, X. et al. **Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer**. *European Urology*, v.67, p.33–41, 2015.

HURBURGH, C.R. et al. **Detection of genetically modified grains by near-infrared spectroscopy**. *Proceedings PITTCON 2000–Science for the 21st Century*, New Orleans, La, 2000.

IQBAL, A.; SUN, D-W.; ALLEN, P. **Review An overview on principle, techniques and application of hyperspectral imaging with special reference to ham quality evaluation and control.** Food Control, v.46, p.242-254, 2014

ISAAA: situação global dos cultivos transgênicos em 2017. Resumo executivo, 2018.

Disponível em:

[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4448754/mod\\_resource/content/1/15306214\\_042018-07-03-ISAAA-Resumo-Executivo%20%281%29.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4448754/mod_resource/content/1/15306214_042018-07-03-ISAAA-Resumo-Executivo%20%281%29.pdf). Acesso em: 20 Jun

2019.

JAMES, C. **Status global das culturas transgênicas comercializadas.** Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), 2013.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. **Computer Aided Design of Experiments,** Technometrics, v.11, n. 1, p. 137 – 148, Feb. 1969.

KLUMPER, W. and QAIM, M. **A Meta -Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops.** PLoS ONE. v.9, p.11, 2014.

KOK, E.J. et al. **DNA methods: critical review of innovative approaches.** Journal of AOAC International, v.85, p.797-800, 2002.

KUMAR, N.; et al. **Review Chemometrics tools use dinanalytical chemistry: An overview.** Talanta, v.123, p.186–199, 2014.

MAGALHÃES, D.F. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na monitorização de processos farmacêuticos.** Lisboa, 2014.

MAGIN, K. et al. **Methods for detection of GMO grain in commerce.** 2000.

MARIOTTI, E. **Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection.** Analytica Chemical Acta, v.453, p.165-172, 2002

METROHM. NIR Spectroscopy. **A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes.** Herisau, Suíça: Metrohm, 2013.

MIRAGLIA, M. et al. **Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain.** Food Chemical Toxicology, v.42, p.1157-1180, 2004.

OBEID, P.J. et al. **Rapid analysis of genetically modified organisms by in-house developed capillary electrophoresis chip and laser-induced fluorescence system.** *Electrophoresis*, v.25, p.922-930, 2004.

PEREIRA, C. M. **A Espectroscopia NIR no Controlo de Qualidade de Solventes Industriais.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior Técnico, 2011.

PETIT, L. et al. **Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay,** *European Food Research and Technology*, v.217, p.83-89, 2003.

RIBEIRO, M.I; et al. **Perception about consumer's knowlegde and confidence in transgenic products.** *Revista de Ciências Agrárias.*, vol. 40, p. 266-273, 2017.

RICHETTI, A. **Estimativa de custo de produção de algodão, safra 2006/07, para o Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.** Comunicado Técnico 125. CPAO, 16p, 2006.

SINGH, S. **Transgenic cotton-its adoption, threats and challenges ahead: A review Subash Singh.** *Journal of Entomology and Zoology Studies*, p.1989-1997, 2018.

STAVE, J.W. **Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – future needs.** *Food Control*, v.10, p.361-374, 1999.

STEINBERG, F. **Biotecnologia farmacêutica e bioterapia: uma visão geral.** *Society for Pharmaceutical Sciences*, v. 12, n. 3, p. 1-17, 2002.

THIEMAN, W. J.; PALLADINO, M. A. *Introduction to biotechnology.* 4. ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2004.

TORRES, A.C. et al. **Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, p.1053-1057, 2003

TOZZINI, A.C. *Detección de OGMs en la Cadena Agroalimentaria.* In: ECHENIQUE, V. et al. **Biotecnología y mejoramiento vegetal.** Buenos Aires: INTA, 2004. p.409-424.

VIEIRA, A. **Debates atuais sobre a segurança dos alimentos transgênicos e os direitos dos consumidores.** *Revista dos Tribunais*, v. 23, n. 60, p. 37-57, 2006.

YAMAGUCHI, H. et al. **Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan.** *Food Control*, v.14, p.201-206, 2003.

YI, W. S.; et al. Gastric cancer differentiation using Fourier transform near-infrared spectroscopy with unsupervised pattern recognition. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.101, p.127-131, 2013

WILKINS, T.A.K. RAJASEKARAN, and D.M. ADERSON, "Cotton biotechnology", *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 19, n° 6, p. 511-550, 2000.

WORKMAN, J.J; WEYER, L. **Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy.** CRC Press, 2007.