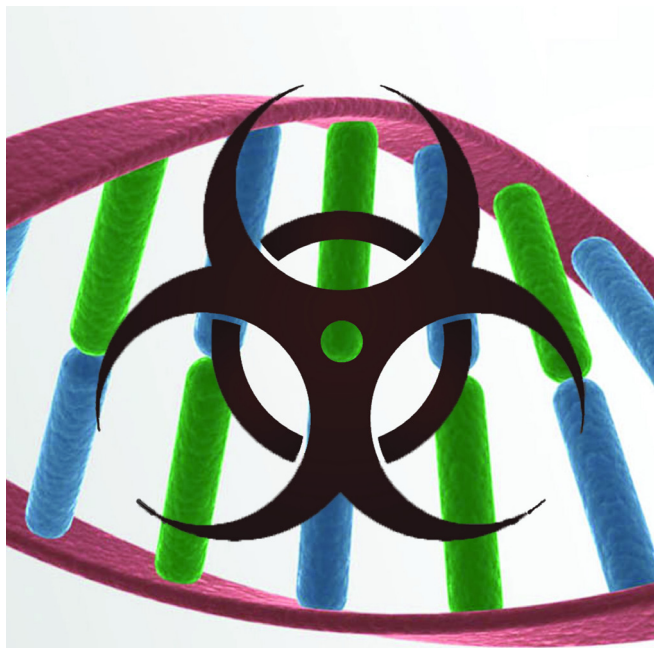


Sistema “Ready-to-Use” para Detecção de OGM: Um Apoio ao Programa de Monitoramento Brasileiro de Biossegurança

Edna Maria Morais Oliveira¹
Tatiane Corrêa de Oliveira²
Felipe Vítório Ribeiro³
Ivanilda Santos de Lima⁴
Thiago Ferreira dos Santos⁵

Ilustração: Gabriel Gomes De Sousa



Introdução

No mundo, a área cultivada com plantas transgênicas avançou dos 1,7 milhões de hectares registrados em 1996 para cerca de 160 milhões de hectares em 2011. As culturas transgênicas autorizadas para comercialização são inúmeras, sendo as principais: soja, milho, algodão e canola. Atualmente, um total de 60 países tem autorização para plantio e comercialização (importação) de plantas geneticamente modificadas (GM). Em 2011, os países em desenvolvimento apresentaram um crescimento na produção de plantas GM de quase 50% e o Brasil assumiu o segundo lugar em produção de variedades GM no mundo (JAMES, 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de culturas GM e esta produção tende a continuar em ascensão. De acordo com as projeções da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra brasileira de 2012/2013 será de 52,01 milhões de toneladas cultivadas (COMPANHIA NACIONAL

DE ABASTECIMENTO, 2013). Atualmente, existem 33 eventos com culturas geneticamente modificadas com parecer favorável da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para comercialização, inclusive eventos que apresentam mais de uma característica inserida (“stacked”) (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA, 2011).

A rotulagem de produtos alimentícios contendo organismo geneticamente modificado (OGM) é obrigatória em muitos países, incluindo o Brasil, de forma a garantir o direito à informação e de escolha do consumidor. O Decreto Nº 4680 de 23/04/2003 estabelece que os alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal, embalados, a granel ou *in natura*, que contenham ou sejam produzidos a partir de OGM, com presença acima do percentual limite de 1% do produto final, devem conter a informação da natureza transgênica do produto (BRASIL, 2003a). Além disso, devem conter também o símbolo definido na Portaria 2.658 do Ministério da Justiça (BRASIL, 2003b).

¹ Engenheira Química, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, edna.oliveira@embrapa.br

² Técnica em Alimentos, assistente da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, tatiane.correa@embrapa.br

³ Graduando em Química Industrial, bolsista do CNPq-Brasil, Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro, RJ, vitorioch@gmail.com

⁴ Nutricionista, bolsista do CNPq-Brasil, Rio de Janeiro, RJ, ivanildalima@gmail.com

⁵ Biólogo, bolsista do CNPq-Brasil, mestrando da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, thfsctaa@gmail.com

A abordagem mais precisa e amplamente usada para a detecção e a quantificação de OGM é a reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) em tempo real, que possibilita a determinação da concentração dos produtos de amplificação durante a fase exponencial da PCR, permitindo determinar a quantidade inicial do DNA amplificado.

O constante aumento de diferentes inserções em um mesmo evento GM mostra a necessidade de desenvolver métodos multi-alvos. Por esse motivo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de fácil utilização para a detecção de vários eventos GM em um único experimento.

Material e Métodos

Amostras e extração de DNA

As amostras utilizadas foram materiais de referência certificados (MRC) de soja *Roundup Ready* (soja RR) da marca Fluka, que foram pesadas e separadas em grupos de dez amostras. O DNA genômico foi extraído utilizando-se um método híbrido CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) + DNeasy. Para confirmar e avaliar o rendimento da extração, o DNA foi preparado para a visualização após eletroforese em gel de agarose 2% e quantificado por espectrometria no UV (260 nm).

Detecção de OGM usando PCR em tempo real

Para a PCR em tempo real utilizou-se kits de detecção TaqMan GMO 35S Soy Detection Kit (Applied Biosystems) para a detecção de soja *Roundup Ready* (soja RR). Foram usados 40 ng de DNA como molde para a PCR em tempo real no aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems).

Liofilização

Os reagentes do TaqMan GMO 35S Soy Detection Kit foram aplicados nas placas e submetidos à liofilização no equipamento THERMO SAVANT RC 300 durante 24 horas.

Antes da PCR em tempo real com os reagentes liofilizados foi analisada uma corrida “referência” com os reagentes não liofilizados. Em seguida, foi realizada a comparação dos ciclos de threshold (Ct) para avaliar o efeito da liofilização.

Resultados e Discussão

Os resultados da Tabela 1 mostram que as reações conduzidas após a retomada de volume dos reagentes liofilizados apresentaram uma pequena alteração nos valores de Ct, com uma média de 2,92 (detecção de soja RR), indicando que há necessidade de aperfeiçoar o processo para que a variância entre os ciclos seja menos que 1,0.

Tabela 1. Comparação dos ciclos de threshold para o kit 35S.

Amostras	Ct						Média	Desvio Padrão	Variância
	1	1'	2	2'	3	3'			
35S									
CN	37,83	34,08	38,89	36,72	—	—	36,88	2,07	4,27
CN	39,53	33,59	—	39,94	37,63	36,68	37,47	2,55	6,51
CP	32,73	32,17	32,35	32,35	31,29	31,26	32,03	0,61	0,37
CP	32,75	32,3	31,98	32,1	31,59	31,44	32,03	0,48	0,23
A1	35,29	33,83	38,19	—	34,4	37,48	35,84	1,91	3,66
A1	34,78	33,88	38,05	38,26	36,36	32,33	35,61	2,37	5,6
A2	36,24	32,53	37,5	37,59	35,76	36,72	36,06	1,87	3,49
A2	32,91	32,57	36,39	37,72	35,72	35,31	35,1	2,01	4,03
A3	34,01	32,85	35,69	35,04	34,29	34,82	34,45	0,98	0,96
A3	33,4	33,01	37,22	—	33,16	35,84	34,53	1,9	3,6
A4	34,24	32,48	35,36	—	34,03	34,15	34,05	1,03	1,06
A4	33,99	32,43	35,04	35,49	33,29	33,84	34,01	1,12	1,26
Média Final	34,81	32,98	36,06	36,13	34,32	34,53	34,84	1,58	2,92

Ct: ciclos de threshold
1', 2' e 3' : placas liofilizadas.

Conclusão

Os resultados mostraram a necessidade de aperfeiçoamento do processo de obtenção do sistema de placas “ready-to-use” para que os dados das corridas conduzidas após a liofilização apresentem menor variação. Ainda assim, houve uma indicação clara da possibilidade do desenvolvimento de um sistema de detecção de OGM “ready-to-use”, para os programas de monitoramento brasileiros, pois foi possível preparar uma placa com os reagentes necessários para detectar diversos eventos GM em um único experimento.

Referências

BRASIL. 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. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 abr. 2003a.

BRASIL. Ministério da Justiça. Portaria nº 2.658, de 22 de dezembro de 2003. Regulamenta o emprego do símbolo no rótulo dos produtos transgênicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 dez. 2003b.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (Brasil). **Commercial approvals**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br>>. Acesso em: 12 jul. 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Brasil). **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: safra 2011/2012, nono levantamento, junho de 2012**. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 3 abr. 2013.

JAMES, C. Executive summary of global status of commercialized biotech/gm crops: 2011. **ISAAA Briefs**, Ithaca, n. 43, 2011.

Comunicado Técnico, 188

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Fone: (0XX21) 3622-9600

Fax: (0XX21) 3622-9713

Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>

E-mail: ctaa.sac@embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2013): tiragem (20 exemplares)

Comitê de Publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta

Membros: André Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas, Leda Maria Fortes Gottschalk, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Torrezan

Expediente

Supervisão editorial: Daniela De Grandi C. Freitas

Revisão de texto: Renata Valeriano Tonon

Normalização bibliográfica: Luciana S. de Araújo

Editoração eletrônica: André Luis do Nascimento Gomes, Gabriel Gomes de Sousa e Marcos Moulin