

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Fabiano Costa Santiliano¹; Bethânia Ribeiro de Almeida ²

¹. Mestre em Biociências e Biotecnologia. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo – CCA-UFES, Alegre, Espírito Santo, Brasil. fabianosantiliano@yahoo.com.br

². Farmacêutica. Mestranda em Ciências Veterinárias. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo – CCA-UFES, Alegre, Espírito Santo, Brasil. bethanialmeida@yahoo.com.br

RESUMO

Avanços na biologia molecular a partir da década de 70 têm levado ao aparecimento de diversas técnicas, que resultaram a modificação genética. Essas técnicas têm sido aplicadas num grande padrão de microorganismos, plantas e animais, resultando no aumento do conhecimento científico dos organismos, suas interações, genética e funções além de permitir a produção de enzimas, agentes terapêuticos e vetores de terapia gênica. A ampliação da área mundial de cultivo com plantas geneticamente modificadas, em especial no Brasil, reflete-se também no aumento de resíduos transgênicos em produtos alimentícios. Na presente revisão, foram discutidos os métodos mais relevantes para detecção de organismos geneticamente modificados, especialmente aqueles que se baseiam na detecção da proteína ou do DNA recombinante, destacando as suas principais propriedades, limitações e vantagens.

PALAVRAS-CHAVES: organismo geneticamente modificado, detecção, PCR, proteínas.

DETECTION METHODS OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS

ABSTRACT

Advances in molecular biology since the early 1970s have resulted in the growth of a wide variety of techniques, which result in genetic modification. These techniques have been applied to a wide range of micro-organisms, plants and animals, resulting in increased scientific understanding of organisms, their interactions, genetics, and functions, as well as enabling production of enzymes, therapeutic agents and gene therapy vectors. The increase on the cultivation of genetically modified crops, especially in Brazil, is paralleled by an increase on the presence of transgenic residues in food products. In this review, the most relevant methods for detection of genetically modified organisms such as recombinant proteins or DNA-based methods were discussed, emphasizing their main properties, limitations and advantages.

KEYWORDS: genetically modified organism, detection, PCR, protein.

INTRODUÇÃO

Diversos avanços no campo da biologia molecular a partir da década de 70 têm levado ao aparecimento de diversas técnicas, que resultaram a modificação genética. Essas técnicas têm sido aplicadas num grande padrão de microorganismos, plantas e animais, resultando no aumento do conhecimento científico dos organismos, suas interações, genética e funções além de permitir a produção de enzimas, agentes terapêuticos e vetores de terapia gênica.

A modificação ocorre quando o material genético de um organismo (DNA ou RNA) é alterado por uma determinada técnica que não ocorre por vias naturais e a modificação pode ser replicada e/ou transferida para outras células ou organismos. Tipicamente a modificação genética envolve a remoção do DNA, manipulação fora da célula e reinserção no mesmo ou outro organismo. O objetivo da técnica é introduzir uma característica nova ou alterada no organismo alvo (TOZZINI, 2004).

A utilização de organismos geneticamente modificados pode oferecer vários benefícios para a prática agrícola, qualidade dos alimentos, nutrição e saúde. Alguns destes produtos podem conferir resistência da planta a insetos, tolerância a herbicidas específicos dentre outras características economicamente importantes, podendo levar à redução do uso de pesticidas. Como toda nova tecnologia, alguns riscos podem estar associados à utilização de organismos geneticamente modificados dentre eles a transferência do gene introduzido para espécies selvagens, desenvolvimento de resistência a pesticidas em espécies de insetos não alvos, modificação das características nutricionais do gênero alimentício além de impactos e alterações no meio ambiente. Para tal, um aprofundamento do conhecimento da técnica se torna necessário além do desenvolvimento de técnicas efetivas que permitam detectar a presença de material genético transgênico dos diversos produtos utilizados pela sociedade, principalmente no que diz respeito aos produtos consumidos como alimentos. Dentre os diversos produtos modificados geneticamente podemos citar o milho Bt que contém material genético de uma de várias cepas de *Bacillus thuringiensis* que produz uma proteína denominada Cry, que ao ser ingerida por larvas atua matando-as por envenenamento. Outros produtos são o algodão Bt, soja resistente a glifosato, etc.

Organismos Geneticamente Modificados no Brasil

A presença de ingredientes derivados de plantas transgênicas em produtos alimentícios vem aumentando no mundo inteiro, inclusive no Brasil. De 2000 a 2003, verificou-se no país um aumento de 5% para 32% desses componentes em grãos, sucos, sopas, salsichas, temperos, entre outros itens analisados por uma empresa incubada na Universidade Federal de Viçosa (MG). O cumprimento das normas para a produção e o comércio dos transgênicos, que o país vem discutindo, depende da existência de laboratórios capazes de detectar e quantificar a presença de resíduos desses produtos nos alimentos.

O cultivo e o comércio de organismos geneticamente modificados vêm crescendo significativamente em todo o mundo, inclusive no Brasil, onde se constatou a presença de soja transgênica em lavouras do sul do país, o que levou o governo a estabelecer normas para o plantio e a comercialização desse grão na safra de 2004, através da Lei 10.814 (de 15/12/2003). Essa ampliação mundial das culturas geneticamente modificadas, em especial a soja e o milho, refletiu-se

também no aumento da presença de resíduos transgênicos em produtos alimentícios que têm em sua composição esses dois tipos de grãos.

No Brasil, a grande maioria dos produtos alimentícios disponíveis no mercado apresenta soja ou milho em sua composição, adicionados na forma natural do grão ou como proteína, gordura, óleo, amido, extrato ou lecitina. Esses produtos incluem biscoitos, chocolates, sopas, temperos, condimentos, sucos, leite em pó, iogurtes e produtos cárneos (salsichas, linguiças, mortadela, presunto, empanados, frango congelado etc.), entre outros.

A possibilidade de que a soja ou o milho transgênicos sejam utilizados na fabricação desses produtos e as discussões, hoje mundiais, quanto à aceitação dos organismos geneticamente modificados e dos produtos deles derivados fazem com que a detecção e a quantificação de resíduos de transgênicos em matérias-primas e em alimentos se tornem essenciais. Muitas empresas alimentícias estão preocupadas em informar aos consumidores que seus produtos não contêm transgênicos, já que estes ainda não são aceitos pela maior parte da sociedade.

Portanto, a existência de instituições, públicas ou privadas, capazes de detectar a presença de organismos geneticamente modificados, e quantificá-los em produtos finais e em matérias-primas revela-se imprescindível para o país, já que existe um limite absoluto para a presença de organismos geneticamente modificados em um produto final e as pessoas têm o direito de saber o que consomem (VAN DUIJN et al., 1999). Esse limite, fixado em 1% pelo Decreto no 4.680 (de 24/4/2003), que trata do direito à informação do consumidor brasileiro, é semelhante ao adotado na Europa. Assim, produtos que contenham acima de 1% de organismos geneticamente modificados em sua composição devem trazer essa informação em suas embalagens.

Diversas metodologias foram desenvolvidas para determinar a presença e quantificar resíduos de transgênicos em amostras de DNA extraídas de grãos e de produtos derivados, com base na técnica de amplificação de fragmentos de DNA denominada reação em cadeia da polimerase (PCR, de *polymerase chain reaction*) (AHMED, 2002).

Nos laboratórios, a detecção e quantificação de transgenes em grãos, alimentos e produtos derivados é feita basicamente pela técnica de PCR. Inicialmente é feito um processo qualitativo, no qual amostras de DNA são extraídas do material em análise e são multiplicadas (amplificadas) as porções desse DNA que correspondem ao transgene, ou seja, ao DNA exógeno que foi transferido ao OGM. No processo de amplificação, são adicionados às amostras outros segmentos de DNA ('primers'), que se ligam especificamente às seqüências transgênicas (já conhecidas, pois têm de ser patenteadas pelas empresas que produzem os organismos geneticamente modificados), dando início à amplificação (WATANABE et al., 2002).

Uma vez detectada a contaminação, são realizados os testes quantitativos, empregando-se técnicas aceitas internacionalmente para essa finalidade. Essas técnicas conseguem determinar o percentual total de contaminação existente na amostra em análise. A metodologia, bastante sensível, é capaz de identificar material transgênico em uma amostra mesmo que ele represente apenas 0,1% do alimento (para proporções menores que esse limite, o resultado é negativo).

Durante os últimos quatro anos, as análises de organismos geneticamente modificados pela AgroGenética, em grãos e diferentes tipos de alimentos revelaram um aumento gradual no número de amostras positivas, evidenciando que, embora o plantio e a comercialização de organismos geneticamente modificados fossem

proibidos no país, eles estavam de alguma forma presentes no mercado brasileiro desde 2000. Naquele ano, a presença de resíduos de organismos geneticamente modificados foi constatada em apenas 5% das amostras testadas na empresa. Em 2001, esse índice subiu para 11,5%, chegando a 28,5% em 2002 e subindo para 32,3% em 2003, até setembro.

Observou-se ainda uma diversificação dos tipos de amostras analisadas. De início, a demanda era principalmente para a análise de grãos, ração e diferentes tipos de proteínas de soja. Em 2001, foram analisados diferentes produtos processados, como sopas, misturas para bolos, salsicha, produtos cárneos, condimentos e temperos. Atualmente, a AgroGenética examina os mais diferentes tipos de amostras.

Os dados das análises permitem concluir que, entre 2000 e 2003, aumentaram gradualmente a presença de grãos transgênicos na safra nacional e a presença de resíduos de transgênicos (em especial de soja) em ingredientes e alimentos derivados no país. Esses dados também indicam a necessidade de o país definir normas claras para a rotulagem de alimentos que contenham resíduos de organismos geneticamente modificados. Para que tais normas sejam de fato cumpridas, é importante dispor de laboratórios qualificados para realizar esse tipo de análise.

A caracterização dos grãos é feita a partir da análise de extratos de isoflavonas, substâncias típicas da soja que funcionam como marcadores químicos. Para isso, os pesquisadores devem, no espectrômetro, observar os compostos extraídos dos grãos, que permitem indicar rapidamente o tipo de soja analisada (MIRANDA et al., 2005).

Até agora, a detecção de organismos geneticamente modificados é feita por técnicas da biologia molecular. Um possível método para a identificação desses grãos é o desenvolvido em 1999 na Universidade Federal de Viçosa (UFV), baseado na técnica conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR). Com a nova metodologia, o processo deve ser mais rápido e específico. Enquanto os outros métodos de detecção trabalham com reações químicas inespecíficas, o espectrômetro de massas tira uma espécie de fotografia dos extratos de isoflavonas, tornando a comparação entre os tipos de soja muito mais precisa (LIPP et al, 2001). Um outro método criado pela empresa Embrapa Hortaliças é extremamente simples e barato, podendo ser utilizado por qualquer pessoa. Desenvolvido inicialmente para detecção de alface com resistência ao glifosato, revelou-se eficiente também para soja (TORRES et al., 2003). O resultado sai em cinco dias e o custo é de menos de cinquenta centavos por planta pesquisada. Numa mistura de água e glifosato (herbicida utilizado nas lavouras de soja), uma semente de soja é colocada em um tubo de ensaio por cinco dias. Aquelas que desenvolverem raízes possuem modificação transgênica. A detecção de sementes transgênicas tem sido uma questão importante para a agricultura e indústria brasileiras. Há hoje no país a entrada de sementes transgênicas de soja, pela fronteira sul do país, sem que haja ainda autorização para o cultivo de transgênicos por parte do governo brasileiro. Com esse método, o pequeno produtor que estiver inseguro da procedência do material a ser plantado em sua propriedade e o pequeno empresário de uma indústria de processamento de soja, por exemplo, podem ter, de forma barata e rápida, certeza de que o material que adquiriram não é transgênico. Há ainda a questão da certificação de material não-transgênico, uma exigência de mercados europeus e asiáticos, que vai ficar extremamente facilitada.

Métodos de detecção de organismos geneticamente modificados

Produtos de organismos geneticamente modificados contêm uma característica adicional codificada pela introdução de um determinado gene que geralmente produz uma proteína adicional que confere a característica de interesse. Diversas matérias-primas como grãos, por exemplo, e produtos processados derivados de plantações de organismos geneticamente modificados poderiam ser identificados através de testes que apontariam a presença do DNA introduzido ou por identificação da proteína produzida pelo material genético introduzido (KOK, 2002). Os diferentes métodos disponíveis podem ser definidos como métodos qualitativos que indicam a presença ou não do material de interesse, e métodos quantitativos (LIPP et al, 2001).

Métodos de detecção baseados em proteínas

Tecnologias de imunoenensaio utilizando anticorpos são ideais para ensaios de detecção qualitativos e quantitativos de diversos tipos de proteínas e matrizes complexas quando o produto de interesse é conhecido (LIPTON, 2000). Podem ser utilizados anticorpos monoclonais ou policlonais dependendo das condições necessárias a determinado teste como especificidade, aplicação particular, tempo e custo. Imunoensaios baseados em anticorpos ligados a uma superfície sólida têm sido usados em dois formatos: competitivo ou método de sanduíche. Duas técnicas, western blot e ELISA têm sido freqüentemente utilizadas para a detecção de materiais transgênicos em diversos produtos (BRETT et al., 1999).

- **Western blot** – o western blot consiste numa técnica altamente específica que permite detectar qualitativamente a presença do material de interesse numa concentração superior ou inferior a um nível predeterminado. As amostras são transferidas para uma matriz de nitrocelulose e previamente desnaturadas. Este método é considerado mais apropriado para trabalhos de pesquisa do que para aplicações de rotina.

- **ELISA** – consiste num teste altamente sensível e econômico. Permite grande volume de processamento, sendo ideais para o grande número de análises laboratoriais quantitativas, não sendo necessário promover a desnaturação da proteína para a realização do teste (ROGAN, 1999).

A otimização e validação de testes de ELISA, além de outras técnicas baseadas em DNA são um importante aspecto da padronização da tecnologia de detecção de organismos geneticamente modificados. Ensaios de validação para análise de alimentos são muito complexos considerando a larga diversidade de matrizes alimentares. Alguns fatores que afetam a otimização incluem: (1) seleção de parâmetros (qualidade dos kits, métodos para teste de proteínas modificadas, tempos de incubação); (2) seleção de limiares (limites para testes positivos e negativos); (3) seleção de controles (caseiro x kit comercial), e (4) ambiente de trabalho (experiência do laboratório na realização dos testes, problemas de contaminação, entre outros). Fatores afetando a validação incluem: (1) eficiência da extração; (2) precisão dos resultados; (3) precisão e habilidade para distinguir entre valores estreitamente relacionados; (4) sensibilidade e limites de detecção; (5) especificidade; (6) reprodutibilidade, e (7) consistência e confiabilidade de detecção. ELISA é o método de escolha para detectar a presença de um determinado

organismo geneticamente modificado em amostras de produtos crus, alimentos semiprocessados e ingredientes processados, admitindo que a proteína expressa não fosse degradada e pudesse ser detectada. Não é recomendado para a análise de produtos alimentares constituídos de muitos ingredientes. Embora testes baseados em proteínas sejam práticos e efetivos, alguns produtos de organismos geneticamente modificados não expressam um nível detectável de proteína.

Métodos de detecção baseados em DNA

Métodos de detecção de DNA são baseados na complementaridade das duas fitas do DNA dupla hélice, que hibridizam de uma maneira seqüência-específica (LIPP et al., 2001). O DNA que é introduzido num determinado organismo consiste de diversos elementos que governam seu funcionamento. Estes tipicamente consistem numa seqüência promotora, num gene estrutural e numa seqüência de parada. Apesar das várias técnicas disponíveis, duas delas, o southern blot e PCR, são mais utilizadas (KOK, 2002).

- **Southern blot** – envolve a fixação de amostras de DNA isoladas em membranas de nylon ou nitrocelulose e posterior teste de hibridização com sonda de DNA da amostra marcada radioativamente.

- **PCR** – consiste na amplificação seletiva de seqüências específicas de DNA através da utilização de “primers” específicos. Vários ingredientes alimentares, como arroz, batata, tomate, milho, têm sido analisados através da técnica de PCR (LIPP et al., 2001).

- **Real-Time PCR** – uma das técnicas mais eficazes para a quantificação de modificações genéticas (BRODMANN et al., 2002).

- **Duplex e multiplex PCR** – utiliza provas combinadas e ‘primers’ alvos para seqüências de diversos produtos modificados (MATSUOKA et al., 2001).

- **PCR quantitativo** – técnica de grande eficiência utilizada por exemplo na detecção da linhagem de milho Bt 176 (PETIT, 2002).

A alta sensibilidade e especificidade da técnica da PCR, a coloca como uma das principais escolhas como métodos de detecção de organismos geneticamente modificados (VOLLENHOFER, et al., 1999). Um dos problemas com o PCR e outras técnicas baseadas em DNA, é que elas não conseguem diferenciar entre os organismos geneticamente modificados e os elementos transgênicos de origem natural como o promotor 35S do CaMV e o terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens*. Isto pode gerar resultados falso positivos para modificações genéticas, necessitando assim de mais estudos visando o aprimoramento da técnica (LIPP et al., 2001).

Biosensores e Microarranjos – constituem dois campos com enorme potencial. Ambos são rápidos, sensíveis, específicos e geram resultados em tempo real. Todavia alguns problemas podem ser apontados: os biosensores são de difícil comercialização devido à sua inerente instabilidade e os microarranjos geram uma vasta quantidade de dados de complexa interpretação (CONCEIÇÃO et al., 2004).

Eletroforese – consiste na utilização de um chip de eletroforese capilar de vidro e um sistema de fluorescência induzida por laser. É um método barato utilizado na detecção dos genes, promotor 35S e terminador NOS (OBEID, 2001).

QUADRO 1 - Kits de detecção disponíveis no mercado

Empresas	Nome do Kit	Matriz Primária
Applied Biosystems	Taq Man [®] GMO 35S detection kit	Alimentos processados, farinha, sementes, grão, tecidos vegetais
Biote Con Diagnostics (Alemanha)	Bt-176 maize	Milho
Envirologix	Quali Plate kit for Roundup Ready corn, Event 603 and corn	Milho Roundup Ready, milho RR
Hong Kong DNA Chips Ltd	GMO Watcher – 1.0	Ingredientes geneticamente modificados, alimentos não processados
Investigen Inc.	Commodity Check PCR based GMO detection kit	Soja, milho, batata, canola, processados, produtos alimentícios intermediários
Promega Corporation	Wizard Magnetic DNA Purification system for food	Milho, feijão-soja, maisena, farinha de soja, cornflakes
Dupont Qualicon	Bax [®] for screening Qualitative GMO	Alimentos
Scil I Diagnostics Gene Scan	GMO <i>IdentKit</i> Liberty Link [™] T 25 corn	Tecidos vegetais, sementes, farinhas, alimentos processados/não processados, aditivos alimentares
Scil Diagnostics/Gene Scan	GMO <i>Ident Kit</i> Roundup Ready [™] soya	Tecidos vegetais, sementes, farinhas, alimentos processados/não processados, óleos não refinados
Teprel Bio Systems Ltd	Bio Kits DNA Extraction kit (GM foods)	Produtos alimentares crus, processados ou intermediários
Strategic Diagnostics	GMO Check Food Ingredient testing	Farinha de soja

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods **Trends in Biotechnology**, v. 20, p. 215-223, 2002.

BRETT, G.M. et al. Design and development of immunoassays for detection of proteins. **Food Control**, v.10, p. 401-406, 1999.

BRODMANN, P.D. et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 646-653, 2002.

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.

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

LIPP, M. LIPP, A. BLUTH, F. EYQUEM, L. KRUSE, H. SCHIMMEL AND G. VAN DEN EEDE. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs, **European Food Research Technology** v. 212, p. 497–504, 2001.

LIPTON, C.R. et al. Guidelines for the validation and use of immunoassays for determining of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. **Food Agricultural and Immunology**, v. 12, p. 153-164, 2000.

MATSUOKA, T. et al. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from live lines of genetically modified maize. **Journal Food Higieny of Society Japan**, v. 42, p. 24- 32, 2001.

MIRANDA, D. M., TILLMANN, M. A. A, BALERINI, F., VILLELA, F. A. Bioensaios na detecção e quantificação de sementes de soja Geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, p. 93-103, 2005.

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.

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.

ROGAN, G.J., DUDIN, Y.A., LEE, T.C., MAGIN, K.M., ASTWOOD, J.D., BHAKTA, N.S., LEACH, J.N., SANDERS, P.R., FUCHS, R.L. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase in Roundup Ready soybeans. **Food Control** v. 10, p. 407-414, 1999.

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. **Biología y mejoramiento vegetal**. Buenos Aires: INTA, p.409-424, 2004.

VAN DUIJN, G.J. et al. Detection methods for genetically modified crops. **Food Control**, v.10, p. 375-378, 1999.

VOLLENHOFER, S., BURG, K., SCHMIDT, J., KROATH, H. Genetically modified organisms in food – screening and specific detection by polymerase chain reaction. **J. Agric. Food Chem.** v. 47, p. 5038-5043, 1999.

WATANABE, E., NUTTI, M. R. Alimentos geneticamente modificados: avaliação de segurança e melhorias de qualidade em desenvolvimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, p. 1-14, 2002.