Detecção de resíduos de transgênicos em grãos e produtos derivados

A experiência da Universidade Federal de Viçosa

Francismar Corrêa Marcelino
Mestre em Genética Molecular, Laboratório de Análises Genéticas - AgroGenética
eg34680@vicosa.ufv.br

Marta Fonseca Martins
Doutora em Genética Molecular, Laboratório de Análises Genéticas - AgroGenética
mmartins@tdnet.com.br

Marcio Antonio Silva Pimenta
Doutor em Genética Molecular, Universidade Federal de Viçosa
marciopimenta@vicosa.ufv.br

Maurilio Alves Moreira
PhD, Bioquímica & Genética de Plantas, Universidade Federal de Viçosa
moreira@ufv.br

Everaldo Gonçalves de Barros
PhD, Biologia Molecular de Plantas, Universidade Federal de Viçosa
ebarros@ufv.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Mais de 58 milhões de hectares são cultivados atualmente no mundo com espécies transgênicas, sendo a soja, o milho, o algodão e a canola, as principais delas. Os países com as maiores áreas cultivadas com transgênicos são, nesta ordem, os Estados Unidos, a Argentina, o Canadá e a China. Estes países respondem por cerca de 99% da área total plantada com cultivos transgênicos. O cultivo de plantas geneticamente modificadas vem crescendo rapidamente em vários países, inclusive no Brasil, onde no mês de setembro foi aprovado, embora com restrições, o plantio de soja transgênica para o ano agrícola 2003/2004 (Medida Provisória 131, de 25 de setembro de 2003).

A demanda por análises da presença de resíduos de transgênicos em matérias-primas e em alimentos tem aumentado significativamente no Brasil, nos últimos dois anos, principalmente após a comprovação do cultivo ilegal da soja transgênica, resistente ao herbicida glifosato, destacadamente no estado do Rio Grande do Sul, com sementes provenientes da Argentina. A maior parte das análises tem sido demandada por empresas exportadoras de grãos de soja e de produtos derivados. Esses produtos são exportados, na maioria, para a Europa, Japão e Coréia. Já antevendo esse cenário, a Universidade Federal de Viçosa (UFV), por intermédio do Instituto de Biotecnologia (BIOAGRO), desenvolveu e otimizou metodologias baseadas na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para determinar a presença e quantificar resíduos de transgênicos em amostras de DNA extraídas de grãos, bem como de seus produtos derivados. Recentemente, a AgroGenética, laboratório incubado na Incubadora de Empresas de Base Tecnológica da UFV, foi credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - Portaria Nº 27, de 15 de maio de 2003, para a "detecção de modificação genética em produtos de origem vegetal".

As modificações genéticas introduzidas que derivam os organismos geneticamente modificados (OGMs) podem ser produzidas por pelo menos três metodologias:

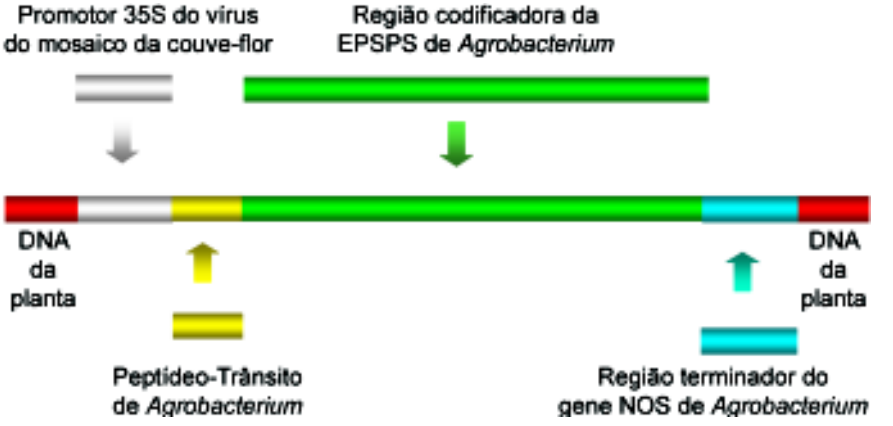

Figura 1 - Representação da construção presente na soja RR® (*Roundup Ready*). Região promotora 35S do vírus do mosaico da couve flor, peptídeo de trânsito de Petúnia, gene que codifica a proteína EPSPS, que confere a resistência ao herbicida, e o terminador do gene da nopalina sintase (NOS).

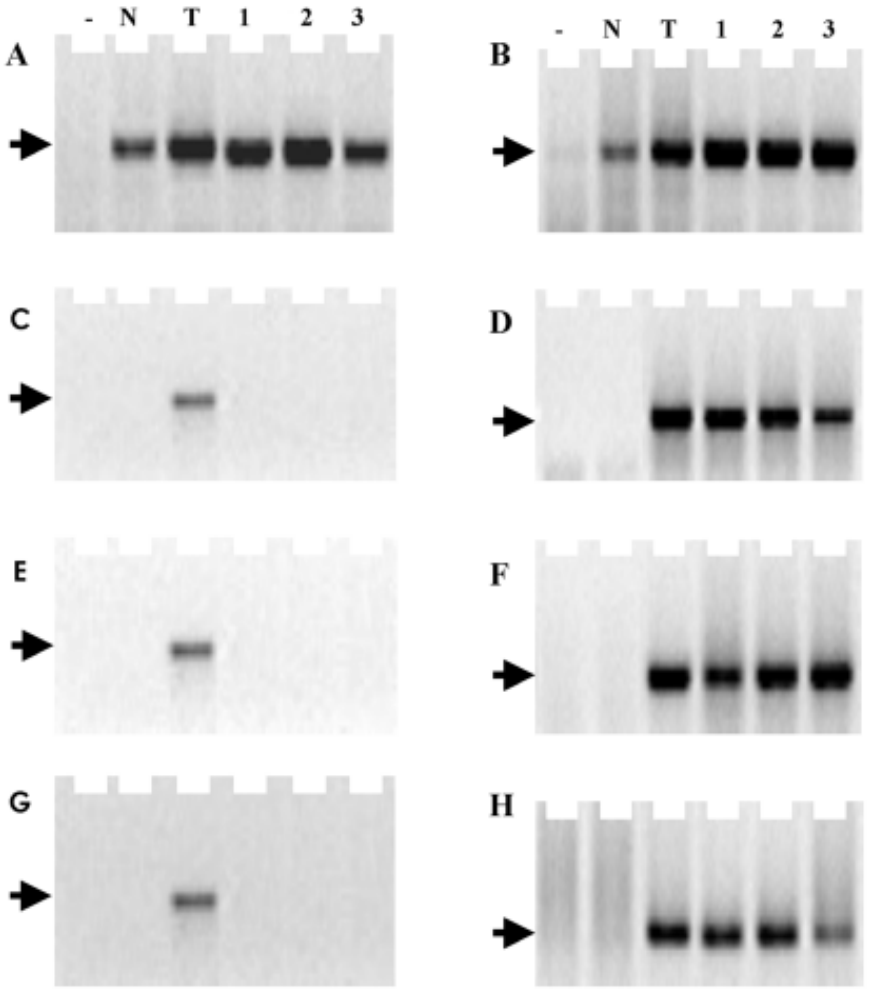

Figura 2 - Análise qualitativa de OGM em amostras de grãos de soja. O DNA das amostras foi extraído pelo método Wizard e amplificado com *primers* específicos que anelam ou no gene da lectina (controle A e B), ou na região do promotor 35S do CaMV (C e D), ou na região terminadora NOS (E e F), ou na região codificadora do gene EPSPS (G e H). Após a reação de PCR, os produtos amplificados foram separados em géis de agarose. À esquerda (A, C, E e G) está exemplificado um resultado negativo e à direita (B, D, F e H), um resultado positivo. Os símbolos nas canaletas representam: (–), reação de PCR sem DNA (controle); N, soja normal (controle); T, soja transgênica (controle); 1, 2 e 3, referem-se a amostras de grãos de soja. As setas indicam as bandas de DNA de interesse.

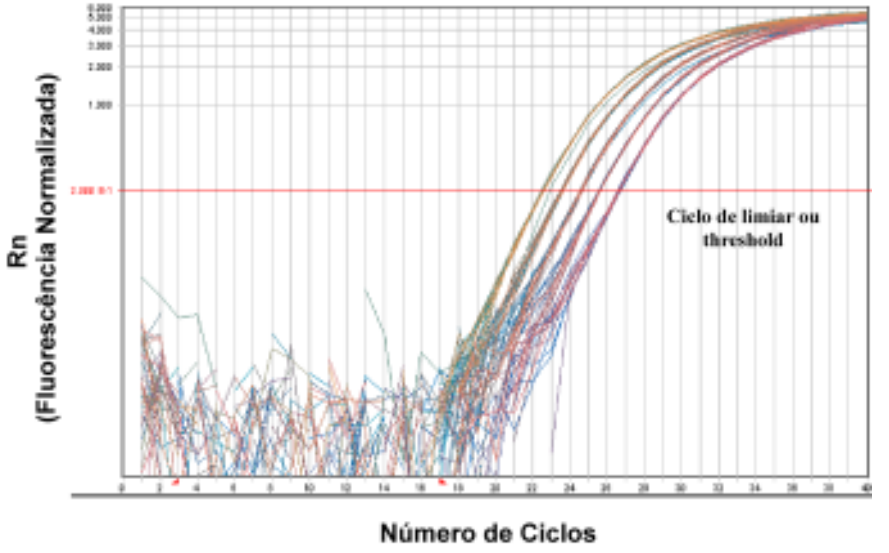

Figura 3 - Curva de amplificação de uma análise quantitativa em PCR de tempo real. A determinação da porcentagem de resíduos de OGM é baseada na comparação da curva de amplificação da amostra analisada com as curvas de amplificação de padrões certificados contendo quantidades conhecidas de OGMs.

- técnicas do DNA recombinante, utilizando vetores para transformação de plantas;
- técnicas envolvendo a introdução direta do material genético no organismo;
- fusão celular por métodos não naturais.

A construção genética utilizada para produzir OGMs consiste de três elementos básicos: o promotor, que controla a expressão do transgene no organismo; a região codificadora, que codifica a proteína de interesse; e a região terminadora, que determina o final do processo de transcrição do gene. Além disso, pode ser usado um gene marcador que serve para selecionar as células que, de fato, foram transformadas. A soja resistente ao herbicida glifosato, por exemplo, tem como região reguladora o promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV); como região codificadora, o gene para a proteína EPSPS de *Agrobacterium tumefasciens*, que confere a resistência ao herbicida, e como região terminadora, o terminador do gene da nopalina sintase (NOS), também de *Agrobacterium* (Figura 1).

A identificação de alimentos geneticamente modificados pode ser feita facilmente com o auxílio de técnicas de biologia molecular. OGMs podem ser identificados pela detecção direta do DNA exógeno nele contido, do mRNA correspondente produzido, da proteína resultante ou, ainda, pela característica introduzida. Os principais métodos analíticos de detecção utilizam a técnica da reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR) para detectar o DNA exógeno, ou métodos imunológicos, como o ELISA, para detectar a proteína. O método analítico escolhido deve ser sensível, confiável, reprodutível, minimizando, assim, falsos positivos e falsos negativos.

Em nosso laboratório a detecção e quantificação de resíduos de OGMs em grãos, ingredientes e produtos derivados é feita pela técnica de PCR. Para tal, é necessária a extração de DNA das amostras e amplificação do fragmento de interesse. Para ser amplificado, o DNA purificado deve apresentar boa qualidade. Além disso, como controle, um gene normalmente presente no organismo, é amplificado em uma reação paralela. Para produtos que contenham soja na sua composição é utilizado o gene da lectina. Para produtos à base de milho, é utilizado o

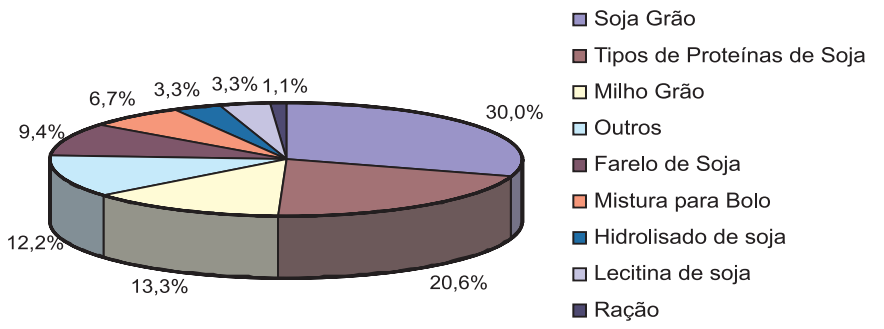

Figura 4 - Percentual dos diferentes produtos analisados para a detecção de OGMs em 2000.

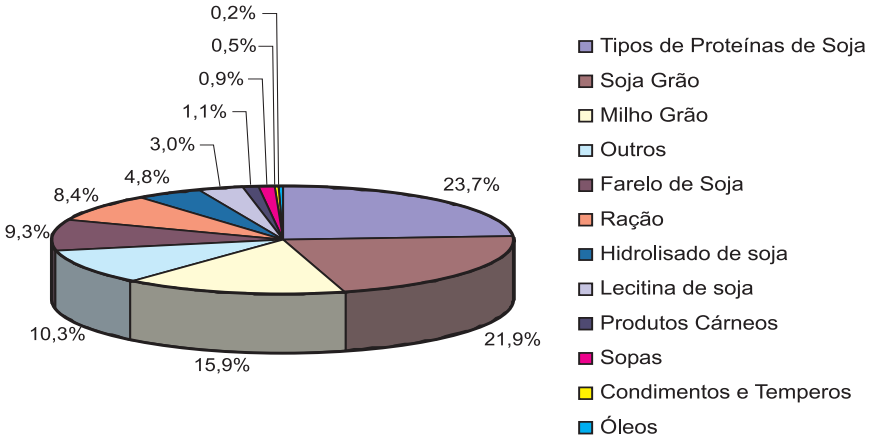

Figura 5 - Percentual dos diferentes produtos analisados para a detecção de OGMs em 2001.

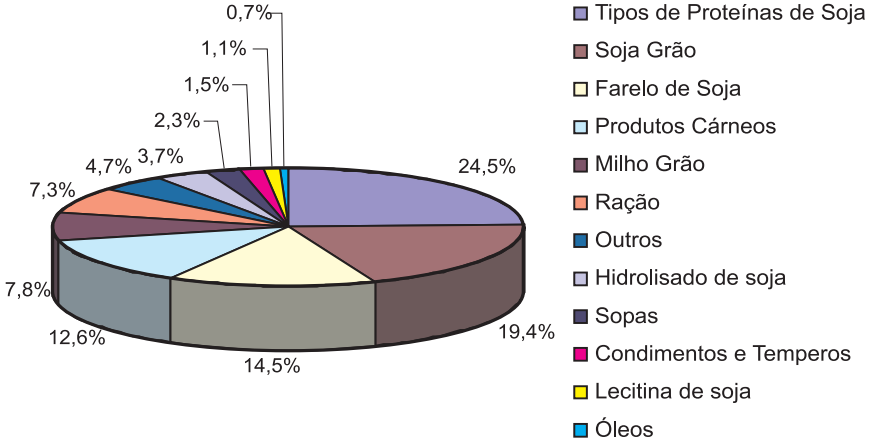

Figura 6 - Percentual dos diferentes produtos analisados para a detecção de OGMs em 2002

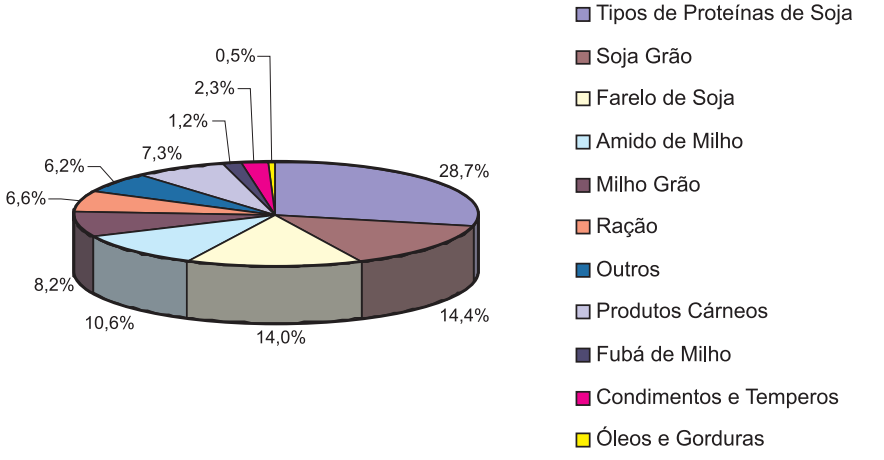

Figura 7 - Percentual dos diferentes produtos analisados para a detecção de OGMs em 2003.

gene da delta zeína. Quando se quer detectar a presença de OGM em uma amostra de salsicha, por exemplo, amplifica-se como controle o gene da lectina, uma vez que a salsicha geralmente contém pelo menos 2% de proteína de soja na sua composição.

O nosso laboratório procura utilizar métodos validados internacionalmente nas suas análises. Para a extração de DNA das amostras é utilizada a metodologia Wizard, método já validado pela Comunidade Econômica Européia. O transgene, ou seja, o segmento de DNA que foi introduzido na planta, é amplificado com *primers* específicos. Para a detecção do gene RR (*Roundup Ready*) são utilizados *primers* que se ligam ou à região do promotor 35S do CaMV, ou à região codificadora, ou ao terminador NOS. Após a reação de PCR os produtos amplificados são separados em géis de agarose. Para as análises quantitativas, o DNA das amostras é extraído pela metodologia PrepMan-Ultra e a análise é baseada no método TaqMan®, que utiliza a técnica de PCR em Tempo Real, para amplificar a seqüência de DNA do promotor 35S, o qual está presente na maioria dos OGMs comercializados até o momento. O procedimento é extremamente preciso devido à perfeita complementaridade entre os *primers* usados na reação de PCR, a sonda TaqMan® e as seqüências alvo de DNA que estão sendo amplificadas. A fluorescência liberada durante a reação é lida pelo sistema de detecção ABI PRISM® 7000 e os dados gerados são analisados eletronicamente. Como a metodologia é bastante sensível, pode-se detectar, numa dada amostra, uma contaminação da ordem de 0,01%. No entanto, devido ao limite de recuperação do DNA durante o processo de extração e também aos erros inerentes ao processo de amostragem, temos trabalhado com um nível de detecção e quantificação da ordem de 0,1%. Isto é, uma amostra contendo 0,1% de transgênicos é classificada como positiva na nossa análise, tendo como referência um padrão certificado. Amostras com uma contaminação menor que 0,1% são classificadas como negativas. A Figura 2 mostra os possíveis resultados obtidos em uma análise qualitativa, enquanto que na Figura 3 pode ser visualizada uma curva de amplificação numa análise quantitativa em tempo real. A quantificação de uma determinada amos-

tra é feita com base na comparação da sua curva de amplificação com as de padrões certificados contendo quantidades conhecidas de OGMs.

Desde o ano de 2000, o laboratório vem realizando a detecção de OGMs em grãos e em produtos derivados. Inicialmente a demanda era concentrada em amostras de grãos de soja e milho e em diferentes tipos de preparações de proteínas de soja. Com o passar dos anos, observamos um aumento na demanda pelas análises bem como uma diversificação das amostras enviadas. Atualmente, temos recebido amostras de condimentos e temperos, óleos, amido de milho, sopas, fubá, entre outras. A partir de 2001 foram feitas as primeiras análises de produtos cárneos. A partir de 2002 houve um aumento expressivo no número de análises para esse tipo de produto. Naquele ano, 12,3% do total de amostras analisadas foram de produtos cárneos. Até setembro de 2003 a porcentagem foi de 7,3%.

As Figuras 4, 5, 6 e 7 mostram a porcentagem de cada classe de produto analisado em relação ao total de amostras desde o ano de 2000. Ao longo dos anos que temos realizado análises de OGM em grãos e diferentes tipos de alimentos, pudemos observar um aumento gradual no número de amostras positivas, demonstrando que embora seja proibido o plantio e a comercialização de OGM no país, estes de alguma forma estão presentes no mercado, pelo menos, desde o ano de 2000. Naquele ano apenas 5% das amostras analisadas foram positivas para a presença de resíduos de OGM. Em 2001, esse percentual subiu para 11,5%. Em 2002, para 28,5%, e até setembro de 2003, 32,3% das amostras apresentaram resultado positivo. A Figura 8 representa de forma gráfica estes resultados.

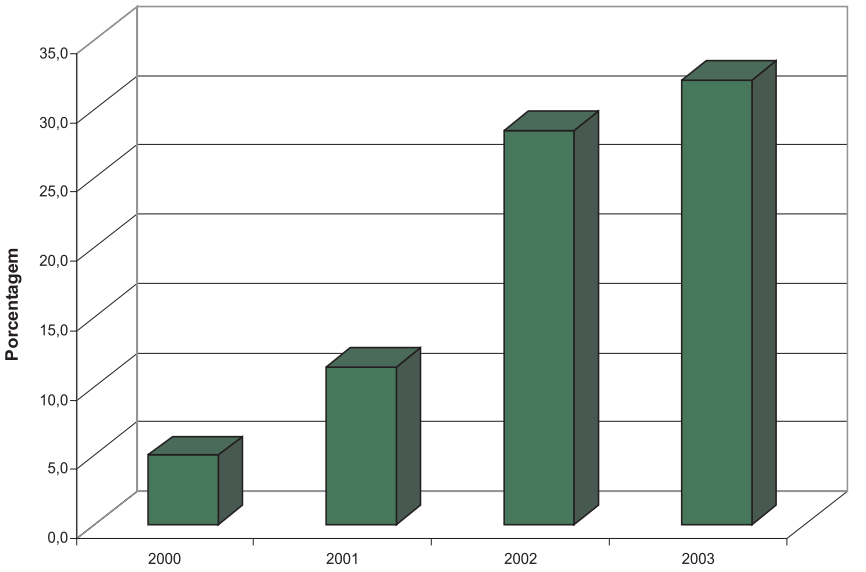

Figura 8 - Percentual de amostras positivas para a presença de resíduos de OGMs com relação ao número total de amostras analisadas, entre os anos de 2000 e 2003.

Quadro 1 - Porcentagem de amostras positivas dentro de cada classe de amostras e com relação ao total de amostras analisadas

Tipo de Amostra	% de amostras positivas pelo total de amostras em 2000	% de amostras positivas dentro da classe analisada em 2000	% de amostras positivas pelo total de amostras em 2001	% de amostras positivas dentro da classe analisada em 2001	% de amostras positivas pelo total de amostras em 2002	% de amostras positivas dentro da classe analisada em 2002	% de amostras positivas pelo total de amostras em 2003	% de amostras positivas dentro da classe analisada em 2003
Soja grão	3,89	12,96	7,74	35,42	6,16	31,69	9,22	64,20
Diferentes tipos de proteínas de soja	0,00	0,0020	0,00	0,00	0,96	3,91	2,13	7,41
Farelo de soja	1,11	11,76	1,37	14,64	7,93	54,72	8,33	54,49
Produtos cárneos	0,00	0,00	0,00	0,00	7,93	63,04	5,32	73,17
Milho grão	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,06	13,04
Ração	0,00	0,00	1,82	21,62	3,56	49,06	2,30	35,14
Hidrolisado de soja	0,00	0,00	0,23	4,76	0,00	0,00	0,18	25,00
Sopas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fubá de milho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	14,29
Condimentos e temperos	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	36,36	1,42	61,54
Lecitina de soja	0,00	0,00	0,00	0,00	0,82	75,00	0,00	0,00
Óleos e gorduras	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	40,00	0,00	0,00
Outros	0,00	0,00	0,23	2,22	0,27	5,88	2,30	37,14

A porcentagem de amostras positivas dentro de cada classe de produtos também sofreu elevação, principalmente no caso de grãos de soja, farelo de soja e ração. A porcentagem de amostras de grãos de soja positivas para a presença de OGM em 2000 foi de 3,89 % com relação ao total de amostras analisadas. Com relação apenas às amostras de grãos analisadas, esse percentual foi de 12,96%, atingindo 35,42%, 31,69% e 64,20%, respectivamente, em 2001, 2002 e 2003. As amostras de farelo OGM subiram de 1,11% do total de amostras analisadas, em 2000, para 8,33% em 2003, enquanto as de ração eram 1,82% em 2001 e 2,3% em 2003. A porcentagem de amostras de produtos cárneos contendo resíduos de OGM foi de 7,93% do total de amostras analisadas e 63,04% com relação ao total de amostras dessa classe de produtos em 2002. Em 2003, esses valores foram de 5,32% e 73,17%, respectivamente. Com relação às amostras de milho e derivados apenas em 2003 começamos a detectar algumas amostras positivas, o que reflete a presença de outros cultivos transgênicos, que não a soja RR®, no mercado mundial. O Quadro 1 mostra a porcentagem de amostras positivas em relação ao número total de amostras analisadas e dentro de cada classe de amostras.

Os nossos dados permitem concluir que no período de 2000 a 2003 houve um aumento gradual da presença de resíduos de transgênicos em grãos, ingredientes e alimentos derivados no país, especialmente com relação à soja. Os dados apontam também para a necessidade de definição de normas claras de rotulagem de alimentos. Para esse fim, é importante que se disponham de laboratórios qualificados para realizar esse tipo de análise.