

# Placas “ready to use” para detecção simultânea de multieventos geneticamente modificados

| **Edna Maria Morais Oliveira**  
Embrapa Agroindústria de Alimentos

| **Tatiane Corrêa Oliveira**  
Embrapa Agroindústria de Alimentos

| **Andressa Moreira de Souza**  
Embrapa Agroindústria de Alimentos

| **Regina Isabel Nogueira**  
Embrapa Agroindústria de Alimentos

| **Felipe Vitório Ribeiro**  
UFRRJ

# RESUMO

O crescimento em âmbito nacional e mundial de áreas cultivadas com plantas Geneticamente Modificadas (GM) através da inserção e modificação de material genético em diferentes organismos originam uma série de novos eventos. Em virtude da distinta regulamentação mundial, buscou-se uma ferramenta de detecção simultânea, para monitorar e/ou controlar o fluxo desses eventos de forma eficaz, uma vez que a autorização ocorre de forma independente em cada país. A placa “ready to use” confere agilidade à técnica de PCR em tempo real, devido à redução do tempo de preparo de análise, além de possibilitar multi-deteção de organismos geneticamente modificados (OGMs), simultaneamente. O presente estudo avaliou a estabilidade das placas, nas seguintes condições: não liofilizada; liofilizada; período (6 meses); e armazenagem (temperatura ambiente, geladeira e freezer). Observou-se que não há variação significativa nos resultados obtidos pelas placas armazenadas no freezer e na geladeira, no mesmo período.

**Keywords:** Genetically Modified, PCR, Ready to use, Stability.

## ■ INTRODUÇÃO

De acordo com a legislação, após manifestação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), compete ao Ministério da Agricultura a emissão de autorizações e registros, bem como a fiscalização de produtos e atividades que utilizem organismos geneticamente modificados e seus derivados destinados ao uso animal, na agricultura, na pecuária, na agroindústria e áreas afins (MAPA, 2016). No Brasil, de acordo com a Lei de Biossegurança, define-se Organismo Geneticamente Modificado (OGM) como o organismo cujo material genético tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética. A maioria dos OGM lançados no mercado mundial são plantas. Sequências genéticas são introduzidas nas plantas por diferentes métodos e, mais comumente, pela transformação mediada por bactérias, produzindo os chamados eventos. As características introduzidas nas plantas são, até hoje, em sua grande maioria, a tolerância a herbicidas e a resistência a insetos. No entanto, os eventos combinados, denominados híbridos, produzidos por cruzamento de dois ou mais eventos com o objetivo de introduzir distintas características numa mesma planta, foram os que tiveram o maior crescimento nos últimos anos (WAIGMANN *et al.*, 2012).

A área cultivada com plantas transgênicas aumentou de 1,7 milhões de hectares em 1996 para cerca de 170 milhões de hectares em 2012 (JAMES, 2012). Em 2013, esses números foram confirmados, pelo registrado de aumento do cultivo de grãos manipulados por técnicas de biotecnologia no mundo, marcando um incremento de 100 vezes comparado ao primeiro ano de plantio – 1996 (JAMES, 2013).

As primeiras regulamentações específicas para a rotulagem dos alimentos GM foram introduzidas pela União Europeia no final da década de 1990. Desde então, mais de 40 países estabeleceram seus próprios regulamentos para rastreamento e/ou rotulagem de produtos GM (ZHANG & GUO, 2011). No entanto, alguns princípios fundamentais da legislação de rotulagem de OGM são compartilhados entre os países. Em particular, há consenso sobre o princípio de que a rotulagem só se aplica àqueles OGM que foram submetidos a avaliações de risco e que tenham sido considerados seguros para o consumo humano, animal e para o meio ambiente. Desta forma, a rotulagem de alimentos GM não tem por objetivo substituir as avaliações de risco e segurança alimentar, ela serve, sim, como uma ferramenta adicional, complementar e potencialmente reguladora (ZEL *et al.*, 2012). A rotulagem tem por finalidade informar aos consumidores que um produto ou ingrediente alimentar é, contém ou provém de produtos ou ingredientes GM.

Os limites de rotulagem foram inicialmente empregados, por consequência da identificação de contaminação incidental, seja pelo transporte, armazenagem dos grãos e outros processos, sendo assim, a definição de um limite de rotulagem tem implicações diretas sobre a necessidade de métodos de detecção quantitativa para atender às legislações

vigentes. Entre os países que adotam a rotulagem obrigatória, há diferenças significativas tanto quanto aos limites dos materiais GM presentes no alimento como para a aplicação desses limites somente para os principais ingredientes individualmente. Os limiares variam entre 0,9%, 1% e 5% (União Europeia, Brasil e Japão, respectivamente) e China com nenhum limite (0%) (GRUERE & RAO, 2007; COSTA & MARIN, 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 N° 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, 2003 a). Além disso, devem conter também o símbolo definido na Portaria 2.658 do Ministério da Justiça (BRASIL, 2003 b).

De acordo com Kluga *et al.* (2012) o constante surgimento de diferentes OGMs mostra a necessidade de desenvolver métodos multi-alvo. A PCR em tempo real baseada nas placas prontas para uso, num sistema de análise multi-alvos para detecção de OGMs, foi recentemente desenvolvido pelo Joint Research Centre (JRC) da Comissão Europeia, em resposta às crescentes necessidades de testes. O sistema de teste inclui ensaios TaqMan® derivados dos métodos validados pela União Europeia (UE). Na montagem do sistema multi-alvos para detecção de OGM, as respectivas condições da reação de PCR foram ajustadas realizar de forma adequada numa única placa de 96 poços (especialmente a concentração dos iniciadores e sondas, além do perfil térmico da reação original). O sistema permite detectar, pelo menos, 0,045% de material de OGM na alimentação humana e animal, em produtos que satisfazem os requisitos legais da UE para métodos de ensaio de OGM.

## ■ MATERIAIS E MÉTODOS

### Otimização dos reagentes

Determinação da concentração de melhor desempenho entre as 5 concentrações de primers (iniciadores) Forward e Reverse descritos na Tabela 1, a partir de solução mãe de 100 µM (100.000 nM), diluída para estoque de 10 µM (10.000 nM).

**Tabela 1.** Otimização dos primers dos eventos MON 89034 e GTS-40-3-2.

Componentes					
	Forward primer	Reverse primer	Taq Man® Master mix	Sonda TaqMan®	H <sub>2</sub> O Milliq
Concentrações	100 nM	100 nM	12,5µL		
	200 nM	200 nM			
	300 nM	300 nM			
	<b>400 nM</b>	<b>400 nM</b>			
	500 nM	500 nM			

Para proceder a análise das placas, os reagentes foram resuspenso com 20 µL de H<sub>2</sub>O Milliq e 5 µL de DNA molde (100 ng), e submetidos a reação de PCR em tempo real utilizando o equipamento ABI 7500 *Applied Biosystems*.

## Montagem de Placas

As placas foram montadas em triplicatas, em relação às amostras, com duplicatas de seus respectivos controles negativos, nas condições descritas na Tabela 2. As concentrações foram escolhidas após teste de otimização utilizando 5 concentrações de cada reagente, para definir a concentração de melhor desempenho.

**Tabela 2.** Preparo de placa para PCR em tempo real.

Componentes	Volume por reação	Concentração final
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	12,5 µL	1x
Forward primer	1,0 µL	400 nM
Reverse primer	1,0 µL	400 nM
Sonda TaqMan®	1,25 µL	250 nM
H <sub>2</sub> O Milliq	4,25 µL	-
DNA molde*	-	-
Volume total	25,0 µL	-

\*DNA molde não é inserido no momento da montagem.

Os eventos alvos (amostras) utilizados foram: GTS-40-3-2 (soja) e MON89034 (milho). Para execução do experimento montou-se 23 placas seguindo o escopo abaixo:

- Tempo 0: sem liofilizar;
- Tempo 0': liofilizada;
- 6 meses x 3 temperaturas (freezer -20°C ± 2, geladeira -4°C ± 2 e temperatura ambiente 25°C ± 5) e;
- 1 mês de placa extra para cada temperatura, para eventuais problemas de execução.

No Fluxograma 1 está representando a placa multi-deteção para PCR em tempo real com os eventos selecionados para o presente experimento. As cores no fluxograma demonstram a possibilidade de aplicação de diversos eventos e seus respectivos controles negativos.

**Fluxograma 1.** Representação da placa para PCR em tempo real.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GTS- 40-3-2.1	GTS- 40-3-2.2	GTS- 40-3-2.3								GTS-40-3-2.CN	GTS-40-3-2.CN
B												
C	MON 89034.1	MON 89034.2	MON 89034.3								MON 89034.CN	MON 89034.CN
D												
E												
F												
G												
H												

Evento GTS-40-3-2 em triplicata (1, 2 e 3) e seu respectivo controle negativo (CN) em duplicata. Idem para evento MON89034.

## Liofilização das Placas

O processo de liofilização foi realizado na Planta Piloto I, na Embrapa Agroindústria de Alimentos, utilizando o equipamento THERMO SAVANT RC 300, no ciclo programado para 30 horas. Ao fim do ciclo, as placas foram seladas com as películas apropriadas, embaladas individualmente com papel alumínio e armazenadas de acordo com o escopo descrito anteriormente.

## PCR em Tempo Real das Placas “ready to use”

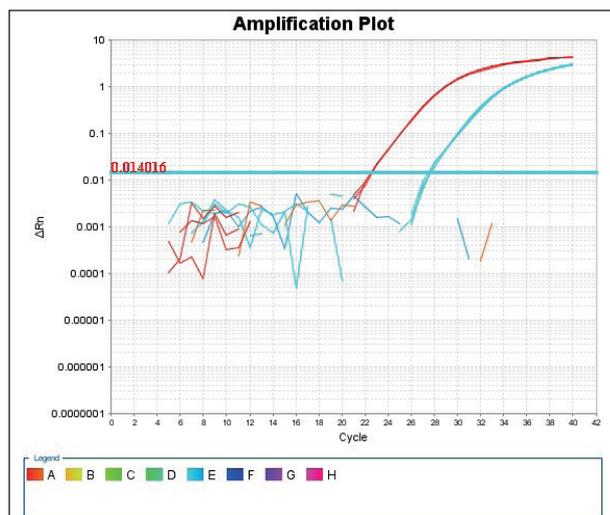
A placa tempo (0), sem liofilizar, foi analisada no dia da montagem, a placa tempo (0’), liofilizada, foi analisada no dia seguinte ao término da liofilização e as demais de mês a mês até finalizar 6 meses. Para proceder a análise das placas, os reagentes foram resuspensos com 20 µL de H<sub>2</sub>O Milliq e 5 µL de DNA molde (100 ng), e submetidos a reação de PCR em tempo real utilizando o equipamento ABI 7500 *Applied Biosystems*, conforme parâmetros descritos na Tabela 3, obtendo desta forma a amplificação da reação de PCR em tempo real, conforme Figura 1.

**Tabela 3.** Parâmetros de termociclagem para condução da PCR em tempo real.

Parâmetros	Incubação*	Ativação da Polimerase	PCR (40 ciclos)	
			Desnaturação	Anelamento/extensão
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tempo (mm:ss)	02:00	10:00	00:15	01:00

\*Requerido para *TaqMan®* Universal PCR Master Mix, n° catálogo 4304437.

Figura1. Resultado da reação de amplificação dos alvos GTS-40-3-2 e MON89034.



Fonte: Laboratório de diagnóstico molecular (ABI 7500).

## ■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento foi planejado e desenvolvido na Embrapa Agroindústria de Alimentos em decorrência da execução do projeto. O sistema “ready-to-use” para detecção de multi-eventos geneticamente modificados foi desenvolvido pelo Joint Research Centre of the European Union (JRC-EU) para ser disponibilizado como placas “pré-spotted” contendo todos os reagentes, incluindo *primers* e sondas, para a detecção individual de todos os 39 eventos GM que circulam no mercado europeu. O sistema de placas do JRC-EU foi adequado a necessidade brasileira para detecção de eventos autorizados no Brasil, reduzindo assim o custo com importação. As placas concebidas para uso interno possibilitam a utilização de *primers* e sondas produzidos no país, através de sequências específicas pré-estabelecidas.

Para detecção dos alvos, foi realizada a técnica de PCR em tempo real, que consiste em monitorar evolução da reação através do Ciclo de *Threshold* (Ct), indicando o n° de ciclos de reação necessários para emissão de fluorescência, que é enviado para o detector do equipamento, que por sua vez, registra o sinal, quantificando o mesmo ao decorrer da reação de amplificação de DNA.

A otimização das concentrações dos reagentes da reação de PCR foi realizada. Os resultados de Ct's mostram que os desvios padrões entre a amostra (0) e (0') são de 0,20 evento (GTS-40-3-2) e 0,06 evento (MON89034), desvios padrões considerados normais e inerentes a análise. A placa (0') foi utilizada com referência, para comparação da estabilidade dos 6 meses de placas multi-alvo, nas distintas temperaturas de armazenagem, conforme demonstrado nas Tabelas 4 e 5. Na tabela 4, pode-se observar que os resultados de Ct's das placas armazenadas a temperatura ambiente ocasionaram um acréscimo nos desvios padrões a partir do 2º mês que, por conseguinte ocasionou desvios padrões e variâncias

elevados ao fim do 6º mês. Analisando os resultados da tabela 5, observa-se que em condições de baixa temperatura (geladeira e freezer) as placas liofilizadas se mantiveram estáveis durante todo experimento, pela observação dos resultados dos desvios padrões de 0,33 evento (GTS-40-3-2) e 0,37 evento (MON89034) e suas, respectivas variâncias, de 0,11 e 0,14 ao fim do 6º mês.

**Tabela 4.** Avaliação de estabilidade das placas multi-alvos, a partir dos resultados de Ct's em 3 condições de armazenagem (temperatura ambiente, freezer e geladeira).

Amostra	0	0'	s.d.	1		s.d.	2		s.d.	3		s.d.				
Condição	NL	L	-	F	G	t. a.	-	F	G	t. a.	-	F	G	t. a.	-	-
GTS-40-3-2	24,86	24,52	0,20	24,85	25,20	25,50	0,40	24,73	24,84	26,78	0,96	25,37	25,37	27,12	1,13	-
MON89034	28,49	28,56	0,06	28,78	28,99	29,63	0,43	28,56	28,79	30,08	0,96	29,21	29,12	32,11	1,63	-
Amostra				4		s.d.	5		s.d.	6		s.d.	var			
Condição	-	-	-	F	G	t. a.	-	F	G	t. a.	-	F	G	t. a.	-	-
GTS-40-3-2	-	-	-	25,42	25,21	29,02	1,83	25,29	25,14	29,72	2,53	25,51	25,44	32,99	3,58	4,65
MON89034	-	-	-	29,53	29,19	34,13	2,42	29,47	29,15	36,64	3,09	29,26	29,49	36,25	3,21	6,36

Não liofilizada (0 e NL); liofilizada (0' e L); desvio padrão (s.d.); 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (meses); freezer (F); geladeira (G); temperatura ambiente (t. a.); e variância (var).

**Tabela 5.** Avaliação de estabilidade das placas multi-alvos, a partir dos resultados de Ct's em condições mais brandas de armazenagem (freezer e geladeira).

Amostra	0'	1		2		3		4		5		6		s.d.	var
Condição	L	F	G	F	G	F	G	F	G	F	G	F	G		
GTS-40-3-2	24,52	24,85	25,20	24,73	24,84	25,37	25,37	25,42	25,21	25,29	25,14	25,51	25,44	0,33	0,11
MON89034	28,56	28,78	28,99	28,56	28,79	29,21	29,12	29,53	29,19	29,47	29,15	29,26	29,49	0,37	0,14

Liofilizada (0' e L); desvio padrão (s.d.); 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (meses); freezer (F); geladeira (G); e variância (var).

Em um experimento preliminar, executado no início do projeto, observou-se elevados desvios padrões e variâncias entre placas liofilizadas e não liofilizadas, preparadas com kits de detecção *TaqMan® OGM 35S Soy detection Kit (Applied Biosystems)*. Segundo tabela de comparação de Ct's de Oliveira *et al.* (2013), para 4 amostras em duplicata de soja Roundup Ready (RR), a média dos desvios padrões e variâncias de cada amostra foram, respectivamente, A1 2,15 e 4,89; A2 2,12 e 3,66; A3 1,94 e 1,92; e A4 1,49 e 1,05. O monitoramento permite a avaliação das condições de armazenamento e as variações inerentes a cada evento.

## ■ CONCLUSÕES

O estudo possibilitou avaliar as condições de armazenamento das placas sob diferentes condições de temperatura e umidade. Conforme observado nos resultados, conclui-se que

as placas prontas podem ser utilizadas por um período de 6 meses, caso mantidas a temperaturas baixas (geladeira e freezer), sem perda de eficiência no resultado. A ferramenta de multi-deteção simultânea, caso implantada, dará suporte às ações de defesa agropecuária no que tange a circulação de OGM no mercado brasileiro, como no monitoramento de eventos não autorizados e do cumprimento da legislação de rotulagem, garantindo ao consumidor o seu direito de escolha.

## ■ REFERÊNCIAS

1. Brasil. (2003 a). Decreto nº 4.680, de 24 abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei no 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. Diário Oficial União. 28 abr 2003.
2. Brasil. (2003 b). Portaria nº 2.658, de 22 dezembro de 2003. Define o símbolo de que trata o art. 2º, § 1º, do Decreto 4.680, de 24 de abril de 2003, na forma do anexo à presente portaria. Diário Oficial União. 26 dez 2003.
3. Costa T.E.M.M., Marin V.A. (2011). Rotulagem de alimentos que contém Organismos Geneticamente Modificados: políticas internacionais e Legislação no Brasil. *Ciência Saúde Coletiva*. 2011; 16(8):3571-82. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232011000900025>.
4. Kluga, L., Folloni, S., Van den Bulcke, M., Van den Eede, G., & Querci, M. (2012). Applicability of the “real-time pcr-based ready-to-use multi-target analytical system for GMO detection” in processed maize matrices. *European Food Research and Technology*, 234(1), 109–118. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-011-1615-5>.
5. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. (2016). Brasília, DF. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/organismos-geneticamente-modificados>. Acesso em: 20 mai. 2016.
6. Gruere G.P., Rao S.R. (2007). A review of international labeling policies of genetically modified food to evaluate India’s proposed rule. *AgBio Forum*. 2007;10(1):51–64.
7. James C. (2012). Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. Ithaca: International Service for the Acquisition of Agrobiotech Applications (ISAAA Brief, vol. 44).
8. James C. (2013). Executive Summary of Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2013. Ithaca: International Service for the Acquisition of Agrobiotech Applications (ISAAA brief, vol. 46).
9. Oliveira E. M. M., Oliveira T. C., Ribeiro F. V., Lima I. S., Santos T. F. (2013). Sistema “Ready-to-Use” para Detecção de OGM: Um Apoio ao Programa de Monitoramento Brasileiro de Biossegurança. Comunicado Técnico 188 - ISSN 0103 5231 – Embrapa.

10. Waigmann E., Paoletti C., Davies H., Perry J., Karenlampi S., Kuiper H. (2012). Risk assessment of Genetically Modified Organisms (GMOs). EFSA J. 2012;10(10):s1008. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.s1008>
11. Zel J., Milavec M., Morisset D., Plan D., Van den Eede G., Gruden K. (2012). How to reliably test for GMOs. Berlim: Springer; 2012.
12. Zhang D., Guo J. The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products. J Integr Plant Biol. 2011;53(7):539-51. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01060.x>