



## DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS EM SEMENTES E PRODUTOS COMERCIAIS A BASE DE SOJA

Rafael Fabiano Müller<sup>1</sup>

Vagner Lunge<sup>2</sup>

Nilo Ikuta<sup>2</sup>

### Resumo

A soja (*Glycine max L.*) é a principal cultura agrícola brasileira, passando dos 33 milhões de hectares na safra 2015/16. Os cultivares transgênicos de *Roundup Ready* (RR) e *Intacta RR2 PRO* (RR2) detêm 93% da área cultivada no Brasil. O evento GTS-40-3-2 (RR) agrega tolerância ao herbicida Glifosato, já o evento BTRR2Y (MON 87701 X MON 89788) combina característica de resistência a lepidópteros (MON 87701) e tolerância à glifosato (MON 89788). A construção dos eventos tolerantes ao glifosato é distinta, necessitando de primers específicos para a detecção. Este estudo objetivou implementar e validar técnicas de detecção e quantificação específica de RR e RR2 em sementes e produtos comerciais. Foi composto um banco de amostras com 43 cultivares RR, 12 cultivares RR2, duas cultivares convencionais, três orgânicas, 3 sem descrição de origem e 10 de produtos comerciais. A análise partiu da extração do DNA pelo método de sílica. Após foi realizada a detecção de RR e RR2 e Lectina (gene endógeno, LE) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para experimentos qualitativos, os ensaios quantitativos foram realizados com farinhas controles de diferentes concentrações de material transgênico, os dados foram processados estatisticamente. Os resultados demonstram confiabilidade na detecção e quantificação de amostras demonstrando  $R^2$  próximos de 0,98. Permitindo estruturar a metodologia para a quantificação de DNA transgênico em amostras de teores desconhecidos, foco das próximas etapas deste estudo.

Palavras-chave: PCR; Intacta; Roundup Ready;

### INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é a principal cultura agrícola brasileira, passando dos 33 milhões de hectares na safra 2015/16. Cultivares geneticamente modificadas (*transgênicas*) conhecidas como *Roundup Ready* (RR) e *Intacta RR2 PRO* (RR2) possuem atualmente 93% da área cultivada no Brasil. O evento GTS-40-3-2 (RR) agrega tolerância ao herbicida Glifosato por meio da introdução do gene da enzima 3-enolpiruvil-shiquimato 5-fosfato sintase (EPSPS), proveniente da cepa CP4 da bactéria de solo *Agrobacterium tumefaciens*. Já o evento BTRR2Y é fruto do cruzamento entre linhagens dos eventos MON 87701 X MON 89788 (RR2) combinando a característica de resistência a insetos da ordem das lepidópteros, presente no evento MON 87701, com a tolerância a herbicidas à base de glifosato, presente no evento MON 89788. A construção dos cassetes exógenos responsáveis pela tolerância ao glifosato é distinta nos dois eventos, até mesmo na região que transcreve a enzima EPSPS, sendo necessário o emprego de primers específicos para detectar cada evento.

O uso de cultivares transgênicas é proibido na agricultura orgânica, sendo recomendado aos produtores o isolamento da área com barreiras naturais para evitar uma possível contaminação (SANTOS, 2013). Por se tratar de um produto com valor agregado e possuir uma boa demanda, seu preço tem se mantido em uma média 50% maior que os

1 Aluno do curso de graduação Agronomia – Bolsista PROBITI/FAPERGS – rrafaelmuller@gmail.com

2 Professor do PPGBioSaúde

produtos convencionais, o que gera bons resultados aos produtores, apesar do custo de produção ser cerca de 10% maior quando comparado ao cultivo tradicional. O controle da produção orgânica é mais difícil na soja e milho devido à disseminação do uso de cultivares OGMs. Os principais estados brasileiros produtores de soja orgânica são Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás. (ANTONIALI et. al., 2012; MDA, 2015).

No Brasil, o Decreto nº 4680/03 determina que qualquer produto que contenha acima de 1% de OGM em sua composição final deve ser rotulado como transgênico. A necessidade de rotulação para produtos alimentícios, assim como a restrição para o uso cultivares transgênicos na cadeia produtiva de soja orgânica tornam necessárias técnicas que possibilitem o rastreamento e a quantificação rápida dos grãos que contenham os eventos transgênicos liberados para plantio no Brasil. A detecção e o rastreamento específico de OGMs podem ser realizados através de técnicas de biologia molecular (como PCR real time). A técnica é baseada na multiplicação *in vitro* do DNA, utilizando oligonucleotídeos para amplificar regiões genômicas específicas, neste caso, com a transgenia específica dos cultivares comercializados em território nacional, tornando possível quantificar o DNA, e estimar a quantidade do grão que existe em cada amostra testada.

O presente projeto objetiva testar amostras de produtos alimentícios e ração animal que utilizem soja em sua composição, e que estejam nas três situações possíveis, rotulado como utilizando mais de 1% de OGM em sua composição, certificados como produtos orgânicos, ou aqueles que não tenham nada declarado a respeito em suas embalagens. Para comprovar a veracidade da descrição dos produtos contida em suas embalagens.

## METODOLOGIA

### Amostras

O banco de amostras do projeto é constituído por 43 cultivares RR, 12 cultivares RR2, duas cultivares convencionais, 3 amostras orgânicas, 3 sem descrição de origem, 16 de produtos comerciais e 15 de farinhas controle. Nessa amostragem são considerados produtos como soja *in natura*, proteína de soja, farinhas, rações humana e animal, biscoitos e salgados. O número amostral dos produtos esta disposto na Tabela 1. As amostras foram adquiridas em locais diversos como supermercados, fruteiras e agropecuárias, de distintas marcas e lotes para cada amostra e a coleta em diferentes cidades do estado do Rio Grande do Sul já as farinhas controle foram confeccionadas de cultivares transgênicos RR e RR2 contendo 100%, 30%, 10%, 3%, 1%, 0,3%, 0,1% e 0%. As farinhas foram confeccionadas a fim de estabelecer os parâmetros de quantificação para as amostras comerciais com valores desconhecidos.

Tabela 1. Banco de amostras

Produtos à Base de Soja	Nº Amostral
Leite de Soja	1
Proteína de Soja	3
Ração Animal	5
Soja <i>in natura</i>	6
Cultivar RR	43
Cultivar RR2	12
Cultivar Convencional	2
Bolacha	2
Farinhas Controle	15

### **Extração de DNA**

Os procedimentos para a extração do DNA partem do maceramento do material em tubos Eppendorf. A extração do DNA é feita a partir de um protocolo do método de sílica (BOOM et al. 1990), no qual, por causa de sua carga negativa, o DNA une-se à sílica e após algumas lavagens é transferido junto a um eluidor para outro tubo Eppendorf pronto para o armazenamento.

### **Amplificação a partir de PCR em tempo real**

A detecção das transgenias é realizada a partir de PCR em tempo real, utilizando *primers* e condições de ciclagem descritos na literatura acadêmica (Cobaiashi 2012 e Liu 2009), sendo utilizado um termociclador *StepOnePlus™*. Os eventos alvos para soja são GTS 40-3-2(RR) e MON89788 (RR2) e gene endógeno da lectina (LE) de soja.

### **Quantificação**

Foram confeccionadas farinhas controle a partir de sementes transgênicas de cultivares RR e RR2 sendo estas postas e misturadas junto a farinha de soja orgânica nas porcentagens planejadas contendo: 100%, 30%, 10%, 3%, 1%, 0,3%, 0,1% e 0% de material OGM. A extração e detecção foram realizadas em triplicata, para estabelecer os parâmetros de quantificação de referência para as amostras com teor desconhecido. Os parâmetros de quantificação basearam-se em BURNS 2004, através dos dados gerados pelo termociclador, levando em conta as médias de Ct. de lectina comparando-os aos Cts. relativos a porcentagem de OGM nas farinhas controles, o que permite estimar a porcentagem de transgenia presente em cada amostra testada. Desta forma, com essa técnica específica é possível constatar se o produto alimentício contém a presença de OGM, possibilitando a identificação correta no rótulo da embalagem destinada ao consumo humano ou animal, conforme Lei nº 11.105/2005 (art. 40) e Decreto nº 5591/2005 (art. 91).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na execução deste estudos, foram realizados testes qualitativos para a técnica, afim de aferir os processos de extração e amplificação em sementes de cultivares registradas no MAPA, sendo 43 cultivares RR, 12 cultivares RR2, duas convencionais e duas orgânicas, afim de assegurar a especificidade dos *primers*, obtendo os resultados esperados, todas as amostras de soja amplificaram para o gene endógeno de lectina, enquanto apenas as cultivares *Roundup Ready* amplificaram para os *primers* RR, para os *primers* específicos de RR2 também obteve-se sucesso em 100% das amostras de cultivares *Intacta*, comprovando a especificidade do método escolhido.

após a execução dos testes qualitativos iniciou-se a etapa de quantitativa do estudo, aplicando ensaios em triplicata com farinhas controle para estabelecer parâmetros estatísticos para avaliação dos resultados das amostras de teor desconhecido, além de realizar a adequação da metodologia de extração para os diferentes tipos de amostras que foram obtidas, sendo realizadas análises qualitativa do material extraído por PCR.

A análise estatística alcançou resultados muito próximos de  $R^2=0,98$  (Imagem 1) para ambos os eventos envolvidos neste estudo. Apontando a confiabilidade da técnica.

A perspectiva para os próximos experimentos é aplicar o método de análise quantitativa nas amostras comerciais que vem sendo extraídas, para mensurar o teor de material transgênico existente em cada uma.

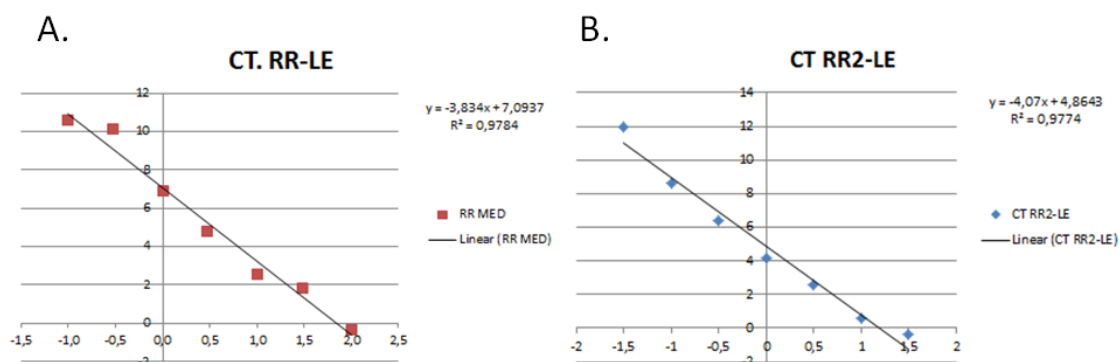


Imagem 1: Os gráficos representam a média de Ct. das triplicatas de RR e RR2 das diluições de material OGM em comparativo com as médias de Ct. de lectina, **A.** para o evento GTS 40-3-2 e **B.** para o evento MON89788.

## CONCLUSÕES

O método de quantificação de material OGM para os eventos GTS 40-3-2 e MON89788 demonstram adequados e confiáveis para o estudo, havendo a necessidade de aplicar o método nas amostras de produtos comerciais para mensurar de teor de DNA transgênico presente em cada uma.

## REFERÊNCIAS

ANTONIALI, S.; SANTOS, N. C. B.; NACHILUK, K.; Milho verde orgânico: produção e pós-colheita. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 9, n. 2, 2316 – 5146, 2012.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J.; Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol.** v.28, p.495-503, 1990.

BURNS M. J.; VALDIVIA H.; HARRIS N.; Analysis and interpretation of data from real-time PCR trace detection methods using quantitation of GM soya as a model system. **Anal Bioanal Chem.**, v.378, p. 1616–1623, 2004.

CÉLERES – Céleres your agribusiness intelligence. **Informativo Biotecnologia**: 2015. Disponível em: [http://www.celeres.com.br/docs/biotecnologia/IB1501\\_150611.pdf](http://www.celeres.com.br/docs/biotecnologia/IB1501_150611.pdf). Acesso em: 16 de Dez. 2015.

COBAIASHI D.M., **Avaliação da Metodologia de detecção e quantificação por PCR em tempo real de organismos geneticamente modificados em alimentos: aspectos de produção, processamento e amostragem**, SP. São Paulo, 2012. 87p. Dissertação ( Mestrado em Ciências dos Alimentos, Área de Bromatologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

CORBISIER, P., BHAT, S., PARTIS, L., XIE, V.R.D., EMSLIE, K.R. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, n.6, p.2143–2150, 2010.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA, International Service for Applications. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/pdf/b49-execsum-english.pdf>. Acesso em: 10 de Dez. 2015.

LIU J.; GUO J.; ZHANG H.; LI N.; YANG L.; ZHANG D. Development and In-House Validation of the Event-Specific Polymerase Chain Reaction Detection Methods for Genetically Modified Soybean MON89788 Based on the Cloned Integration Flanking Sequence. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 22, 2009.

MAPA, 2014- Instrução normativa nº 17, de 18 de junho de 2014. [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/IN-17.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/IN-17.pdf) . Acesso em 15 de Mar. 2016.

MDA, 2015 – Ministério Desenvolvimento Agrícola. Agricultura Familiar produz 70% dos alimentos consumidos pelos brasileiros. Disponível em: <http://www.mda.gov.br/>. Acesso em 15 de Nov. 2015.

SANTOS, N. Cultura do Milho. Sistema de Produção de Milho Orgânico: 2013. Disponível em: <http://www.zeamays.com.br/sistema-de-producao-de-milho-organico/>. Acesso em: 6 de Nov. 2015.